

**Anwendung des Comet Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese) an
Zellen von Fischen zum Nachweis gentoxischer Wirkungen im
aquatischen Biomonitoring: Wasserproben test *in vitro*, Blutzelltest
ex vivo und methodische Optimierung**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Sebastian Nehls

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, PhD

Gutachter/innen:

- 1. Prof. Dr. Werner Kloas**
- 2. Prof. Dr. Helmut Segner**
- 3. Prof. Dr. Thomas Braunbeck**

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abstract (English)	1
Abstract (German).....	1
Zusammenfassung.....	2
Vorbemerkung.....	4
1. Einleitung	5
1.1 Warum Gentoxizitätsmessungen?	5
1.1.1 Die zentrale Rolle der DNA	5
1.1.2 Zum Begriff der Gentoxizität	5
1.1.3 Folgen gentoxischer Belastungen.....	5
1.1.4 Gentoxische Belastungen der aquatischen Umwelt.....	8
1.1.5 Bedeutung des Wassers und die Rolle von Fischen	8
1.1.6 Nachweis gentoxischer Wirkungen.....	10
1.2 Zur Entstehung von DNA-Schädigungen.....	11
1.3 Gentoxizitäts-Biomarker und -Biomonitoring.....	14
1.4 Nachweis von DNA-Schäden als DNA-Strangbrüche im Comet Assay.....	15
1.5 Fragestellungen, Vorgehensweisen und Begründung der Arbeit	19
1.5.1 Fragestellungen	19
1.5.2 Vorgehensweisen und Begründungen der Untersuchungen.....	20
1.5.2.1 Zur Begründung der Arbeit	20
1.5.2.2 Untersuchung methodischer Aspekte	20
1.5.2.3 Verlauf von DNA-Schädigung und DNA-Reparatur in RTG-2-Zellen	21
1.5.2.4 Reaktion der Zelllinien RTG-2 und RTL-W1 auf Monosubstanzen	22
1.5.2.5 Testung von nativen Wasserproben an Fischzelllinien	22
1.5.2.6 Wirkungsbezogene Analytik	23
1.5.2.7 Biomonitoring von Fischen aus der Mosel.....	23
1.5.2.8 Begleituntersuchungen	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Fischzellkultur und Einsaat der Zellen zur Exposition.....	25
2.2 Exposition der Zellen	26
2.3 Durchführung der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay).....	26
2.4 Fluoreszenzmikroskopie und Bildauswertung	27
2.4.1 Durchführung von Fluoreszenzmikroskopie und Bildauswertung.....	27
2.4.2 Fluoreszenzmikroskopisches Material	30
2.4.3 Material und Parameter bei der Bildauswertung	31
2.5 Zeitbedarf des Tests.....	32
2.6 Zytotoxizitätstest mit FDA/EtBr	32
2.6.1 Durchführung	32
2.6.2 Anmerkungen zur Zytotoxizität	32
2.7 Getestete Substanzen und Proben.....	33
2.7.1 Testsubstanzen.....	33
2.7.2 Wasserproben	33
2.7.3 Sedimentextrakte	35
2.8 Chemikalien, Medien, Lösungen und weitere Materialien.....	35
2.8.1 Chemikalien für Zellkultur und Arbeiten mit Zellen.....	35
2.8.2 Chemikalien und Material für die Einzelzell-Elektrophorese	36
2.8.3 Chemikalien für den Zytotoxizitätstest.....	37
2.8.4 Rattenleber-S9-Mix	37
2.9 Statistik.....	38
2.9.1 Datenbearbeitung und -bewertung.....	38
2.9.2 Graphische Darstellung von Versuchsergebnissen als Boxplots.....	41
2.10 Methodik beim Biomonitoring von Fischen aus der Mosel	42
3. Ergebnisse	44
3.1 Methodische Aspekte	44
3.1.1 Welche methodischen Faktoren beeinflussen das Testergebnis im Comet Assay?.....	44
3.1.2 Elektrophoresedauer.....	44

3.1.3 Bildanalyse: Vergleich unterschiedlicher Parameter.....	46
3.2 Eigenschaften und Reproduzierbarkeit des Testsystems am Beispiel von NQO	52
3.2.1 Vorbemerkungen zu Eigenschaften und Reproduzierbarkeit.....	52
3.2.2 Basisdaten des Systems (RTG-2-Zellen/NQO).....	53
3.2.3 Variabilität/Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	57
3.2.3.1 Ziele der Reproduzierbarkeitsuntersuchung.....	57
3.2.3.2 Reproduzierbarkeit anhand von Streuungsmaßen.....	58
3.2.3.3 Reproduzierbarkeit anhand der statistischen Teststärke.....	60
3.2.3.4 Reproduzierbarkeit anhand von LOEC-Werten	62
3.2.3.5 Bedeutung von Stammlösungen als Varianzquelle für das Testergebnis.....	63
3.3 DNA-Schädigungskinetiken und DNA-Reparatur-Inhibition.....	65
3.3.1 Fragestellungen	65
3.3.2 Kinetiken der DNA-Schädigung in RTG-2-Zellen und optimale Expositionszeit.....	66
3.3.3 Experimente zu den zellbiologischen Ursachen der DNA-Schädigungskinetiken.....	68
3.3.3.1 Die Rolle des metabolischen Abbaus von NQO: Transfer-Experimente mit der Expositionslösung	68
3.3.3.2 Inhibitionsversuche mit Aphidicolin zur Rolle der DNA-Reparatur.....	68
3.3.3.2.1 Bestimmung der Wirksamkeit und geeigneter Konzentrationen von APC und NQO	68
3.3.3.2.2 Expositionskinetiken bei NQO/APC-Kombination	70
3.3.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen zu den zeitabhängigen Experimenten.....	73
3.4 Einzelsubstanztests.....	73
3.4.1 Zytotoxizität	73
3.4.2 Ansprechbarkeit, Sensitivitäten und Dosis-Wirkungs-Kurven	73
3.4.2.1 Definition des Sensitivitätsbegriffs	73
3.4.2.2 Überblick: verwendete Zellsysteme und Chemikalien.....	74
3.4.2.3 RTG-2-Zellen.....	75
3.4.2.3.1 RTG-2 / NQO.....	75
3.4.2.3.2 RTG-2 / AAF.....	76
3.4.2.3.3 RTG-2 / BaP.....	77
3.4.2.3.4 RTG-2 / DMNA	78
3.4.2.3.5 RTG-2 / NF	79
3.4.2.3.6 RTG-2 / MNNG	80
3.4.2.4 RTG-2-Zellen mit S9-Zusatz.....	81
3.4.2.4.1 RTG-2 + S9 / BaP	81
3.4.2.5 β -Naphthoflavon-induzierte RTL-W1-Zellen.....	83
3.4.2.5.1 RTL-W1 / BaP	83
3.4.2.5.2 RTL-W1 / NQO	85
3.4.3 Vergleich der drei Zellsysteme RTG-2, RTG-2 + S9 und RTL-W1+ β NF	88
3.4.3.1 NQO	88
3.4.3.2 BaP.....	89
3.4.4 Zusammenfassung der Einzelsubstanzergebnisse	92
3.5 Umweltproben.....	94
3.5.1 Native Oberflächenwasser und Zusatzproben im Rahmen eines Gentoxizitätstest-Projektes.....	94
3.5.1.1 Das Testprogramm und seine Ziele.....	94
3.5.1.2 Testbewertung nach unterschiedlichen Verfahren	96
3.5.1.3 Ansprechbarkeit: Häufigkeit und Stärke positiver Testergebnisse, Sensitivität des Testsystems	96
3.5.1.4 Unterschiedliches gentoxisches Potenzial verschiedener Probenahmeorte.....	98
3.5.1.5 Chemisch analysierte Inhaltsstoffe der Proben im Hinblick auf gentoxische Wirkungen	100
3.5.1.6 Unterschiede im jahreszeitlichen Verlauf	103
3.5.1.7 Einfluss der Probenlagerung	104
3.5.1.8 Kontaminierte Probe "Sanierungsgebiet Gaswerk Düsseldorf".....	105
3.5.2 Wirkungsbezogene Analytik/TIE: Sedimentextrakte.....	106
3.5.2.1 Beschreibung und Ziele.....	106
3.5.2.2 Zytotoxizität.....	107
3.5.2.3 Gentoxizität der Extrakte an drei Fischzellsystemen	107
3.5.2.4 Exemplarische TIE-Untersuchung der Subfraktion F3	111
3.6 Biomonitoring	116
3.6.1 Der Comet Assay im Kontext des Biomonitoring-Programms "PNETOX" - Fragestellung	116
3.6.2 Übertragung der Methodik auf Blutzellen des Döbels.....	116
3.6.3 Methodische und biologische Einflüsse auf die DNA-Schädigung im Comet Assay.....	116

3.6.3.1	Hat das Probenvolumen einen Einfluss?	117
3.6.3.2	Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede	117
3.6.3.3	Bestehen Korrelationen zwischen Körpergröße/-gewicht, dem Alter und DNA-Schäden?	120
3.6.4	Gentoxizität bei den Fischen der verschiedenen Probenahmestellen	125
3.6.5	Relation zu den Biomarkern EROD-Induktion und AChE-Inhibition	127
3.6.5.1	AChE-Inhibition	128
3.6.5.2	EROD-Induktion	129
3.6.6	Chemische Analytik	131
4.	Diskussion	134
4.1	Übertragung und Anpassung des Comet Assay-Protokolls auf Fischzelllinien <i>in vitro</i> - technisch-methodische Parameter	134
4.1.1	Die methodischen Parameter im Comet Assay an Fischzellen <i>in vitro</i>	134
4.1.2	Funktionsprinzip der DNA-Migration im Comet Assay	136
4.1.3	Untersuchte Einzelparameter	138
4.1.3.1	Elektrophoresedauer	138
4.1.3.2	Schlussfolgerungen zur Elektrophoresedauer	140
4.1.3.3	Bildanalyse: Vergleich unterschiedlicher Parameter	140
4.1.4	Zur Ermittlung der optimalen Expositionszeit	143
4.1.5	Variabilität und Reproduzierbarkeit	143
4.1.6	Beurteilung der methodischen Aspekte: Umweltproben-Test <i>in vitro</i> mit Fischzellen gegenüber der "Originalmethode"	148
4.2	<i>In vitro</i> -Testung von Monosubstanzen und komplexen Umweltproben mit den Fischzelllinien RTG-2 und RTL-W1	149
4.2.1	Einzelsubstanztests (Monosubstanzen) <i>in vitro</i>	149
4.2.1.1	4-Nitrochinolin-1-oxid (NQO)	149
4.2.1.2	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)	154
4.2.1.3	Nitrofurantoin (NF)	155
4.2.1.4	Benzo[a]pyren (BaP)	156
4.2.1.5	N-2-Acetylaminofluoren (AAF)	157
4.2.1.6	Dimethylnitrosamin (DMNA)	158
4.2.1.7	Zusammenfassung der Monosubstanzversuche	159
4.2.2	Umweltproben-Tests <i>in vitro</i> (aktives Biomonitoring)	159
4.2.2.1	Native Oberflächenwasser	159
4.2.2.2	Kontaminierte Probe "Sanierungsgebiet Gaswerk Düsseldorf"	162
4.2.2.3	Wirkungsbezogene Analytik/TIE: Sedimentextrakte	162
4.2.2.4	Zusammenfassung zu den Umweltproben-Tests <i>in vitro</i>	163
4.3	Zellbiologische Aspekte als Einflussfaktoren der Gentoxizität und ihre Indikation im Comet Assay	163
4.3.1	Einfluss von Metabolisierungskapazität und enzymatischer Ausstattung der Zelllinien	163
4.3.1.1	Vergleich von RTG-2 und RTL-W1+βNF bei Monosubstanzen und Umweltproben	163
4.3.1.2	Metabolisierungskapazitäten und Induzierbarkeit von RTG-2- und RTL-W1-Zellen	164
4.3.1.3	Bewertung des Testsystems mit RTL-W1- gegenüber RTG-2-Zellen	167
4.3.2	DNA-Schädigungskinetiken und DNA-Reparatur-Inhibition	169
4.3.2.1	Zu den Kinetiken von DNA-Schadensentstehung und -Rückgang	169
4.3.2.2	Zur Zunahme/Entstehung der DNA-Schäden	169
4.3.2.3	Zur Abnahme und Reparatur der DNA-Schäden und den Experimenten mit Aphidicolin (APC)	170
4.3.2.4	Der Comet Assay als Methode zur Untersuchung von DNA-Reparatur?	172
4.3.2.5	Literaturvergleich von Schädigungskinetiken bei Fischzellen und anderen Zelltypen	173
4.3.2.6	Persistenz von DNA-Schäden	174
4.3.2.7	Bedeutung der DNA-Reparatur für die biologische Relevanz des Tests	175
4.3.2.8	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen zu Schädigungskinetiken und DNA-Reparatur-Inhibition	176
4.3.3	Mögliche Störfaktoren: Zytotoxizität und Apoptose	177
4.3.3.1	Vorbemerkungen zu unspezifischen Effekten	177
4.3.3.2	Zytotoxizität als Störfaktor im Comet Assay	177
4.3.3.3	Apoptose als Störfaktor im Comet Assay	179
4.4	Passives Biomonitoring von Fischen aus der Mosel	182
4.4.1	Methodisches	182
4.4.2	Zu den Ergebnissen des Biomonitoring	183
4.5	Beurteilung des Comet Assay an Fischzellen	188

4.5.1 Literaturvergleich von Prinzip und Methodik des Comet Assay mit anderen Gentoxizitätstests	188
4.5.2 Beurteilung anhand methodischer Argumente	188
4.5.3 Biologische Relevanz, Validierung gegenüber anderen Gentoxizitätstests und Begriffe zur Quantifizierung	190
4.5.4 Möglichkeit der Kombination mit anderen Gentoxizitätstests (Testbatterien).....	200
4.5.5 Abschließende Beurteilung des Comet Assay als Umwelt-Gentoxizitätstest	201
4.6 Ausblicke.....	207
5. Literatur.....	211
Anhang 1	226
Testergebnisse für Wasserproben.....	226
Anhang 2	228
Exemplarische Darstellung von Einzelversuchsergebnissen (als Boxplots) für Oberflächenwasserproben.....	228
Anhang 3	229
Einzelergebnisse zum zeitlichen Verlauf des DNA-Schadens in Abb. 13 (NQO an RTG-2-Zellen)	229
Anhang 4	230
Ergebnisse der chemischen Analysen im Mosel-Testprogramm "PNETOX" 1998.....	230
Anhang 5	231
A 5 Überblick über Prinzipien und Methodiken anderer Gentoxizitätstests im Vergleich mit dem Comet Assay	231
A 5.1 Comet Assay.....	231
A 5.2 Alkalische Filterelution, alkalische Entwindung und DNA-Elektrophoresen.....	231
A 5.3 Nick Translation Assay, Einzelstrang-DNA-ELISA.....	233
A 5.4 Adduktnachweise mittels ³² P-Postlabeling-Methode und HPLC	233
A 5.5 UDS-Test.....	234
A 5.6 Mikronukleus-Assay, Chromosomenaberrationstest, SCE-Test	235
A 5.7 SOS-Chromotest, Ames-Test und umu-Test	236
A 5.8 Mutationstests an Eukaryonten <i>in vivo</i>	237
A 5.9 Literatur zu den Anhängen	239
Publikationsliste	240
Erklärungen gemäß § 5, Abs. 2 der Promotionsordnung	242
Danksagung.....	243

Abstract (English)

Bodies of Water are both vital resources and pollutant sinks for a multitude of contaminants. Therefore, biological effect tests and biomonitoring of aquatic samples are of particular importance to detect potential environmental hazards. The "comet assay" (single cell gel electrophoresis) is an indicator for DNA strand breaks and was explored and applied as a genotoxicity test in the present study. Known genotoxic substances were used to determine the detection limits and dose-response relationships for the cell lines RTG-2 and RTL-W1 (from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) in vitro, and to adapt methodological parameters to the cells. The test was very sensitive to 4-Nitroquinoline-1-oxide. This substance was therefore well-suited to serve as positive control in further experiments. In order to evaluate the measurement data, an appropriate statistical procedure was developed, which also took "historical" controls into account. The time course of DNA damage in the test system using RTG-2 cells was determined, and relationships between the origin of DNA strand breaks, DNA repair capacity and the metabolizing capacity of the cells was investigated by means of inhibition of DNA repair with Aphidicoline. In the second stage, native water samples from the rivers Rhine and Elbe and further surface waters were tested with the comet assay, using RTG-2 cells. 15 out of 49 samples showed genotoxic effects. In a third stage, erythrocytes of feral chub, *Leuciscus cephalus*, from the Moselle river were examined with the comet assay. The fish from three measuring stations showed elevated values of DNA damage compared to fish sampled from a downstream station. There were only partly correlations with the results from additional biomarkers. Chemical analyses of water and tissue samples did not permit conclusions on effect-causing substances. However, this emphasizes the importance of biological tests in dealing with complex environmental samples.

Abstract (German)

Gewässer sind Lebensgrundlage, jedoch gleichzeitig Schadstoffsinken für eine Vielzahl von Kontaminanten. Biologische Wirkungstests und das Biomonitoring aquatischer Proben sind daher besonders wichtig, um Umwelt-Gefahrenpotenziale erkennen zu können. Der "Comet Assay" (Einzelzell-Gelelektrophorese) ist ein Indikator von DNA-Strangbrüchen und wurde hier als Test auf gentoxische Wirkungen erprobt und angewandt. Mit bekannten, gentoxischen Substanzen wurden Nachweisgrenzen und Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Zelllinien RTG-2 und RTL-W1 (aus der Regenbogenforelle, *Oncorhynchus mykiss*) in vitro ermittelt und methodische Parameter an die Zellen angepasst. Der Test reagierte sehr sensitiv auf 4-Nitrochinolin-1-oxid. Die Substanz war daher geeignet, um in weiteren Versuchen als Positivkontrolle zu dienen. Zur Bewertung der Messdaten wurde ein geeignetes statistisches Verfahren gefunden, das auch historische Kontrollen mit einbezog. Der zeitliche Verlauf der DNA-Schädigung des Testsystems mit RTG-2-Zellen wurde ermittelt, und durch Inhibition der DNA-Reparatur mit Aphidicolin wurden Zusammenhänge zwischen der Entstehung von DNA-Strangbrüchen, der DNA-Reparaturkapazität sowie der Metabolisierungskapazität untersucht. In einer zweiten Phase wurden unbehandelte Wasserproben aus Rhein, Elbe sowie weitere Oberflächenwasserproben mit dem Comet Assay an RTG-2-Zellen getestet. Bei 15 von 49 Proben zeigten sich gentoxische Effekte. In einer dritten Phase wurden Erythrozyten von freilebenden Döbeln, *Leuciscus cephalus*, aus der Mosel mit dem Comet Assay untersucht. Die Fische von drei Messstellen zeigten erhöhte Werte von DNA-Schädigungen, gegenüber einer vierten, stromabwärts gelegenen Messstation. Korrelationen mit den Ergebnissen zusätzlicher Biomarker ergaben sich nur teilweise. Chemische Analysen von Wasser- oder Gewebeproben ließen keine Rückschlüsse auf verursachende Kontaminanten zu - gerade dies unterstreicht jedoch die Wichtigkeit biologischer Tests bei komplexen Proben.

Zusammenfassung

Veränderungen der DNA in den Zellkernen von Organismen können schon durch geringe Umwelteinflüsse entstehen. Solche gentoxischen Veränderungen sind wegen der Schlüsselfunktion der DNA als Informationsträger von besonderer Bedeutung. Aus DNA-Schädigungen können diverse akute und chronische Schadeffekte resultieren, so kann z. B. Krebs verursacht und die Reproduktion gestört werden. Gentoxische Potenziale in der Umwelt können so auch verändernde und schädigende Auswirkungen auf Populationen verschiedener Arten einschließlich des Menschen besitzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der "Comet Assay" (Einzelzell-Gelelektrophorese) als Testmethode zum Nachweis gentoxischer Wirkungen im aquatischen Biomonitoring eingesetzt. Es kamen sowohl *in vitro*-Tests an Fischzellkulturen als auch die *ex vivo*-Anwendung an Blutproben von Fischen zum Einsatz. Die noch relativ neue Methode wurde so auf Fischzellen übertragen, ihre Anwendbarkeit und Aussagekraft geprüft und nach diesen Kriterien in Beziehung zu anderen Gentoxizitätstests gesetzt und bewertet.

Erstes Ziel war die methodische Anpassung und Weiterentwicklung des Comet Assay als einfaches *in vitro*-Testsystem für gentoxische Aktivität in Wasserproben mit den permanenten Fischzelllinien RTG-2 und RTL-W1. Dazu wurden Experimente mit wässrigen Lösungen von sechs bekannten, gentoxischen Referenzsubstanzen durchgeführt ("Monosubstanztests"), Dosis-Wirkungs-Beziehungen erstellt und wichtige Parameter der Einzelzell-Gelelektrophorese untersucht. Im Rahmen eines Gentoxizitätsprojektes des BMBF, in das die vorliegende Arbeit eingebunden war, wurde auch ein statistisches Beurteilungsverfahren zur Positiv-/Negativ-Bewertung der Testergebnisse entwickelt.

Für den erwünschten Einsatz als Kurzzeit-Test wurde anhand der Referenzsubstanz NQO (4-Nitrochinolin-1-oxid) eine optimale Expositionszeit von 2 h bei RTG-2-Zellen ermittelt. Nach dieser Zeit war eine maximale gentoxische Reaktion erreicht. An diesem Testsystem wurde auch der Einfluss der Dauer der alkalischen Elektrophorese auf den gemessenen Effekt gezeigt. Durch Verlängerung der Elektrophoresedauer von 20 auf 35 min wurde die Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve auf das 2,6-fache erhöht. Die Nachweisgrenze der Substanz wurde jedoch dadurch nicht signifikant gesteigert. Dosis-Wirkungs-Experimente mit den sechs Referenzsubstanzen zeigten, dass ein zum Teil hochsensitiver Nachweis gentoxischer Aktivität *in vitro* mit den Fischzelllinien möglich war, jedoch substanzspezifisch starke Unterschiede bestanden. Die Nachweisgrenzen (LOEC) mit RTG-2-Zellen lagen in der Reihenfolge abnehmender Sensitivität bei folgenden Konzentrationen: NQO: 13-25 nmol/l; MNNG: 70-140 nmol/l; BaP: 2-4 µmol/l; NF: 130 µmol/l; AAF und DMNA: keine nachweisbare Wirkung. Die Experimente mit der Zelllinie RTL-W1, vorinduziert mit β -Naphthoflavon (β NF), zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Nachweisgrenzen für NQO und BaP, jedoch einen flacheren Anstieg in der Dosis-Wirkungs-Kurve für NQO (Faktor 1/4) und einen stärkeren für BaP (Faktor 2) im Vergleich zu RTG-2 - also eine umgekehrte Tendenz der beiden Zelllinien in Bezug auf sogenannte „direkte“ und „indirekte“ Gentoxine.

Um die Gentoxizitätstestung von Umweltproben zu optimieren und die biologische Relevanz der Ergebnisse besser beurteilen zu können, ist ein Verständnis der zellbiologischen Vorgänge notwendig. Die wichtigsten Rollen in Bezug auf Gentoxizität spielen hier die Metabolisierung (Aktivierung und Inaktivierung) der Gentoxine sowie die DNA-Reparatur. Die DNA-Reparatur ist einerseits in Fischzellen nicht ausreichend untersucht und spielt andererseits eine besondere Rolle für den Comet Assay, da die dort angezeigten DNA-Strangbrüche zum Teil durch DNA-Reparatur-Endonukleasen in Reaktion auf gentoxische Noxen entstehen. Zur Untersuchung der DNA-Reparatur und weiterer Vorgänge wurden Kinetiken der Effekte während und nach der Exposition von RTG-2-Zellen an NQO untersucht. Dort wurde gezeigt, dass die DNA-Strangbrüche innerhalb der ersten Stunde rasch zunehmen und nach ca. 2 h ein Maximum erreichen. Nach etwa 3 h begann die Reaktion abzuklingen und erreichte nach 15-24 h das Niveau der Negativkontrolle. Die im Comet Assay angezeigten DNA-Strangbrüche konnten im Fall von NQO auf Nukleotid-Exzisionsreparatur, alkali-labilen DNA-Veränderungen und oxidativen Schäden beruhen. Inhibitionsversuche mit Aphidicolin deuteten an, dass hier von den verschiedenen möglichen DNA-Reparaturwegen vor allem die Nukleotid-Exzisionsreparatur für die Rückbildung der detektierten Schäden infrage kam.

Nach der Anpassung des *in vitro*-Systems erfolgte dessen Anwendung an komplexen Umweltproben. Dazu wurden native (unbehandelte) Oberflächenwasser aus Rhein und Elbe in den Jahren 1997 und 1998 und von weiteren Standorten - in der Regel in 1:2-Verdünnung an RTG-2 - geprüft. Diese Arbeit basierte auf einer monatlichen Probennahme über einen Zeitraum von einem Jahr. Bei 15 von 49 nativen Oberflächenwasserproben zeigten sich gentoxische Effekte. Wenn ohne das Kriterium, dass mindestens 2 von 3 Versuchswiederholungen signifikant positiv sein mussten,

ausgewertet wurde, so waren es 52 von 147 Einzelversuchen, also mehr als ein Drittel. Im Mittel ergab sich im Comet Assay mit RTG-2-Zellen ein höheres gentoxisches Potenzial für den Rhein als für die Elbe. Stromabwärts gelegene Probenahmestellen (Düsseldorf und Köln) wiesen häufigere und stärkere Effekte auf als die stromaufwärts gelegenen Probenahmestellen. Wasserproben vom Wahnbachtal-Stausee zeigten dagegen kaum ein gentoxisches Potenzial. Eine stark kontaminierte Spezialprobe (BTEX u.a.) erwies sich an RTG-2-Zellen nur als nicht- bis schwach toxisch, dagegen zeigte aber die Prüfung mit RTL-W1 eine gentoxische Wirkung.

Bei den Flusswasserproben konnte kaum eine Korrelation mit Daten aus chemischer Analyse hergestellt werden. Projektintern analysierte gentoxische Stickstoffverbindungen ergaben keinen Aufschluss über Ursachen der Gentoxizität. Allenfalls war beim Rhein stromabwärts eine gemeinsame Zunahme von chemischen Summenparametern, sichtbaren Schwebstoffen und Gentoxizität feststellbar.

Als weitere Umweltproben wurden Extrakte eines stark kontaminierten Sediments aus dem Fluss "Spittelwasser" in der Bitterfelder Chemieregion getestet. Diese Umweltproben waren also im Gegensatz zu den zuvor getesteten nicht nativ, sondern aufkonzentriert. Von den drei eingesetzten Zellsystemen (1) RTG-2, (2) RTG-2 plus S9-Aktivierung und (3) β NF-aktivierten RTL-W1 erwiesen sich Letztere bei diesen Proben als das empfindlichste. Der Comet Assay wurde hier exemplarisch in das Konzept einer wirkungsbezogenen Analytik ("Toxicity Identification and Evaluation") einbezogen. Das Ziel war, die gentoxische(n) Komponente(n) in dem Extrakt zu identifizieren. Nachdem Gentoxizität als bloße Folge von Zytotoxizität ausgeschlossen wurde, wurde die Analyse mit dem Comet Assay auf eine besonders gentoxische Subfraktion, die aus dem Grundextrakt gewonnen wurde, eingegrenzt. In diesem speziellen Fall wurde dann gezeigt, dass hier nicht die verdächtige Hauptkomponente, das Insektizid Dimethylparathion, sondern das Extraktionsmittel gentoxisch wirkte. Damit wurde zwar keine gentoxische Komponente analysiert, die spezifisch für die Umweltprobe war, aber die grundsätzliche Anwendbarkeit dieser Technik demonstriert.

Es wurde gezeigt, dass der Comet Assay mit Fischzelllinien *in vitro* ein geeignetes Verfahren zur Gentoxizitätstestung von Einzelstoffen und komplexen Umweltgemischen ist. Die Detektion indirekter Gentoxine/Karzinogene hängt von der metabolischen Kapazität des verwendeten Zellsystems ab. Die in dieser Arbeit beobachtete höhere Reaktivität von RTL-W1- gegenüber RTG-2-Zellen bei Umweltproben und indirekten Gentoxinen könnte auf eine höhere metabolische Kompetenz der RTL-W1 zurückzuführen sein.

Die Vielseitigkeit des Comet Assay macht Vergleiche an sehr unterschiedlichen Zellsystemen und Fragestellungen möglich. Zur Demonstration dieser Tatsache und zum Vergleich wurde der Assay von der *in vitro*- auf die *in vivo*-Situation und vom Labor auf das Freiland übertragen. Im Rahmen eines Biomonitoring-Projekts in Frankreich ("PNETOX" 1998) wurden Erythrozyten von freilebenden Döbeln (*Leuciscus cephalus*) aus der Mosel untersucht. Bei den Fischen von drei Messstellen zeigten sich mittlere bis hohe Werte von DNA-Schädigungen, während die Fische der vierten, stromabwärts gelegenen Messstation signifikant niedrigere DNA-Schäden der Erythrozyten aufwiesen. Eine eindeutige Relation zu anderen im Programm gemessenen Biomarkern oder bestimmten Schadstoffen konnte nicht festgestellt werden, wenn auch beispielsweise bei der Messstation mit der niedrigsten Schädigung ebenfalls die niedrigsten Werte für PCBs gemessen wurden.

Abschließend wird in der vorliegenden Arbeit der Wert des Comet Assay im Umwelt-Biomonitoring und seine Aussage über biologisch relevante (folgeschwere) DNA-Schäden diskutiert. Dabei wird auch der Bezug zu anderen Methoden der Gentoxizitätsmessung hergestellt. Es wird gefolgert, dass der Comet Assay vor allem durch Flexibilität und Sensitivität hervorsteicht und anderen Methoden mit gleichem Endpunkt und gleichem biologischen System meist überlegen sein sollte. Zur Erweiterung des gentoxischen Detektionsspektrums sollte er aber mit Methoden für andere gentoxische Endpunkte kombiniert werden - Gleiches gilt umgekehrt, d. h., der Comet Assay stellt eine wichtige Erweiterung dieser Methoden dar. Vor allem für das *in vitro*-Screening und für kontrollierte *in vivo*-Expositionen ("aktives Biomonitoring") ist er geeignet, während beim "passiven Biomonitoring" noch offene Fragen bestehen, die vermutlich im Zusammenhang damit stehen, dass die indizierten DNA-Schäden von der Zelle regulierbar und z.T. kurzzeitig reversibel sind. Der Test weist qualitativ eine gute Reproduzierbarkeit auf, unter quantitativen Gesichtspunkten besitzt er jedoch eine relativ hohe Varianz der Ergebnisse zwischen verschiedenen Experimenten oder Laboratorien. Obwohl der Test bereits relativ schnell durchgeführt werden kann, besteht für die Routinetestung noch Verbesserungsbedarf in der Erhöhung des Probendurchsatzes pro Zeiteinheit und in einer Erleichterung der Bildauswertung für den Experimentator. Diese Ziele werden in der gegenwärtigen Forschung verfolgt und sind zum Teil bereits verwirklicht worden.

Vorbemerkung

Der überwiegende Teil der Arbeit wurde vom 01.10.1995-31.12.1998 am UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Leipzig, in der Arbeitsgruppe Aquatische Ökotoxikologie bei Herrn Privatdozent (jetzt Prof.) Dr. Helmut Segner durchgeführt.

1. Einleitung

1.1 Warum Gentoxizitätsmessungen?

1.1.1 Die zentrale Rolle der DNA

Die DNA besitzt als Informationsträger der Zelle eine zentrale Rolle nicht nur für die Unterhaltung der zellulären Lebensfunktionen, sondern für das Überleben der Arten überhaupt. Sie besitzt einerseits eine *aktive* Rolle - die Genexpression, die in vielfacher Wechselwirkung mit den sonstigen Zellfunktionen steht, - stellt andererseits bei der Reproduktion für sämtliche existierenden Organismen die wichtigste Matrize für die Weitergabe *genetischer* Information an die Nachkommen dar. Fortpflanzung kann ohne DNA nicht stattfinden. Entsprechend der Schlüsselfunktionen der DNA können DNA-schädigende - also *gentoxische* - Einflüsse schwerwiegende Wirkungen auf Zellen, Organismen und Populationen ausüben, die im Folgenden (1.1.3) beschrieben werden.

1.1.2 Zum Begriff der Gentoxizität

Gentoxizität ist der Oberbegriff für sämtliche das Erbmateriale schädlich verändernde Wirkungen. Gentoxische Wirkungen betreffen die Chromosomen oder das DNA-Molekül; die unmittelbaren Folgen werden durch spezifische Begriffe wie *Aneuploidie*, *Chromosomenaberration*, *Schwesterchromatidaustausch (SCE)*, *Deletion*, *Inversion*, *Mutation*, *Addukt*, *Einzel- oder Doppelstrangbruch* und weitere beschrieben (zu den Kategorien genetischer Änderungen s. z. B. Hoffmann 1996 und Walum et al. 1990). Veränderungen des Phänotyps sind hier nicht einbezogen – diese können als *Folge* einer gentoxischen Schädigung auftreten. Die Erzeugung von Krebs (Karzinogenität) kann beispielsweise durch Mutation von Onkogenen oder Tumor-Suppressorgen eingeleitet werden (s.u.). Phänotypische Veränderungen werden auch in einigen Mutationstests, wie z. B. dem Ames-Test, als direkte Anzeiger einer genetischen Veränderung herangezogen.

1.1.3 Folgen gentoxischer Belastungen

Die möglichen Folgen von DNA-Schädigungen reichen von akuten zu chronischen Effekten und können auf der Ebene von Einzelindividuen oder von Populationen betrachtet werden. Im Folgenden wird vor allem auf den Bezug zu aquatischen Ökosystemen und Fischzellen eingegangen, die Themen dieser Arbeit sind.

DNA-Schäden können die Beeinträchtigung oder den Verlust bedeutender Funktionen der Zelle bewirken, sodass diese z. B. bei starker akuter Schädigung absterben kann (Zytotoxizität). Bei Vielzellern kann dies dann zur Schädigung der betroffenen Gewebe oder Organe führen. Zu den eher chronischen Effekten in Organismen kann beispielsweise die Entstehung von Krebserkrankungen (Karzinogenese) gerechnet werden. Man nimmt an, dass sich bei der Karzinogenese Zellen (bzw. *eine* Zelle) meist in mehreren Schritten zu Tumorzellen umwandeln, wobei genetische Veränderungen vorausgehen (Initiation), dann weitere, z. B. proliferationsstimulierende Faktoren hinzukommen (Promotion) und darauf wiederum weitere Veränderungen folgen (z. B.

Wegfall von Apoptose und Kontaktinhibition u.a.) (Tumorprogression) (Alberts et al. 1994; Farber & Sarma 1987; Parlar & Angerhöfer 1991). Viele Karzinogene sind Mutagene (es existieren aber auch Karzinogene, die epigenetisch wirken). Der kausale Zusammenhang von Mutagenität und Karzinogenität kann für einige Substanzen als nachgewiesen gelten: Tumoren können durch mutagene Substanzen erzeugt werden, und in den (z. B. Onko-) Genen der Tumorzellen können genau die Mutationstypen wiedergefunden werden, die typischerweise durch das Mutagen erzeugt werden (am Beispiel der Regenbogenforelle gezeigt: Bailey et al. 1996). Die Annahme, dass ähnliche Wirkmechanismen ebenso für andere mutagene Substanzen zutreffen, liegt nahe. Wie oben erwähnt, wird außerdem angenommen, dass genetische Veränderungen in vielen Fällen eine Voraussetzung für die Karzinogenese sind. Dazu zählen z. B. aktivierende Mutationen von Proto-Onkogenen wie K-ras oder inaktivierende Mutationen von Tumor-Suppressorgenen wie p53. K-ras-Aktivierung ist z. B. an der Regenbogenforelle für die Substanzen Aflatoxin B₁, Dimethylbenz[a]anthracen und Diethylnitrosamin belegt (Bailey et al. 1996). Schließlich sind Korrelationen von gentoxischen Kontaminationen in der Umwelt und dem Auftreten von Krebs in den exponierten Populationen bekannt (s.u.).

Epigenetische Karzinogene sind im Gegensatz zu den oben genannten Substanzen krebbsfördernde Stoffe, die nicht über eine Veränderung der DNA wirken, sondern z. B. auf die Mechanismen der Signaltransduktion in den Zellen und so z. B. übermäßige Zellproliferation fördern. Epigenetische Stoffe können mit Versuchen auf Cancerogenität, aber nicht mit bloßen Gentoxizitätstests erfasst werden. Typische epigenetisch wirkende Karzinogene sind die sog. Tumorpromotoren (z. B. einige Östrogene und Tetradecanoylphorbolacetat).

Die karzinogene Wirkung von Substanzen wurde vor allem experimentell bei Rodentien untersucht und auf diesen Daten bauen meist auch Verzeichnisse karzinogener Substanzen auf. Ein Nachweis karzinogener Wirkung in Umweltsituationen ist dagegen vor allem beim Menschen schwieriger. Im Humanbiomonitoring existieren oft zu viele unbekannte Bedingungen, sodass ein hohes Maß an Unsicherheit in die kausale Interpretation der Ergebnisse gelangt. Z.T. stützt man sich auch auf Untersuchungen, bei denen überdurchschnittlich starke Expositionen z. B. durch Chemieunfälle u.ä. zustande kamen. Für die vorliegende Arbeit stehen Korrelationen zwischen Kontamination der aquatischen Umwelt und dem Auftreten von Krebs bei Fischen im Mittelpunkt des Interesses. In Fischen und anderen aquatischen Organismen lassen sich solche Korrelationen z.T. sogar leichter als beim Menschen nachvollziehen (Baumann 1998; Wirgin & Waldmann 1998). Zu den Läsionen, die in Zusammenhang mit Umweltverschmutzungen gebracht werden konnten, zählen vor allem Leber-/Gallen- und Haut-Neoplasmen (=Tumoren) sowie "präneoplastische" Veränderungen und degenerative/nekrotische Schäden in diesen Organbereichen (Harshbarger & Clark 1990). Eine besonders hohe Prävalenz (Anzahl der Erkrankungsfälle zu einem bestimmten Zeitpunkt) ist bei benthischen Fischen, die in Kontakt mit dem kontaminierten Sediment stehen, festzustellen (Übersicht z. B.: Baumann 1998), so wurden z. B. in einer Untersuchung von 1978 (Pierce et al. 1978) bei einem Anteil von 92 % der untersuchten Fische Leber-Abnormitäten und bei 32 % Hepatomas gefunden - auch höhere Prävalenzen wurden schon gefunden. Eine der betroffenen bodenlebenden Arten ist z. B. *Ictalurus nebulosus* (kleiner Katzenwels, engl.: Brown Bullhead Catfish)

(Baumann 1998; Baumann & Harshbarger 1995; Baumann et al. 1987). Dieser Süßwasserfisch wurde vor allem im Bereich der Great Lakes und einiger anderer Flüsse in den USA untersucht. Bei den marinen Fischen sind z. B. Plattfische wie *Pleuronectes vetulus* (eine Schollenart, engl.: English Sole) u.a. betroffen, die die kontaminierten, städtenahen Häfen und Buchten wie den Puget Sound (Pazifikküste der USA, Staat Washington) (Reichert et al. 1998; Malins et al. 1984; Malins et al. 1985; Myers et al. 1990), Boston Harbor (Murchelano & Wolke 1991) oder die Mündung des Hudson River bei New York (Smith 1979) bewohnen (beides Atlantikküste der USA). Es existieren weitere Untersuchungen, die hauptsächlich aus den USA und Kanada stammen (Moore & Myers 1994; Black et al. 1982; Black 1983; Myers et al. 1994; Mikaelian et al. 2002; Pinkney et al. 2001), aber auch Arbeiten, die das Mittelmeer (Pietrapiana et al. 2002), einen schwedischen Fjord (Falkmer et al. 1978) oder die Ostsee (Ljungberg 1976) betreffen, sind vorhanden. Die Korrelation von Verschmutzungen mit dem Auftreten von Tumoren und "präneoplastischen" Veränderungen ist also reichlich belegt und die entsprechenden Arbeiten sind hier gar nicht vollständig aufzählbar. Auch ein Sinken der Prävalenz entsprechender Schäden in den Populationen nach dem Wegfall der Kontaminationsquelle konnte gezeigt werden (Baumann & Harshbarger 1995). Es liegt also gewissermaßen "kumulative Evidenz" vor, und außerdem genügend experimentelle Belege (Bunton 1996), denn neuere Versuche an Regenbogenforellen lieferten die größte Datenbasis die bislang zu der Thematik überhaupt existiert (Williams 2012 berichtet über Großversuche mit z.B. 40800 Tieren). Trotzdem gibt es nur wenige Arbeiten, die - über eine einfache Korrelation hinaus - den Zusammenhang bei *freilebenden* Fischen überzeugend belegen können (z. B. Reichert et al. 1998; Myers et al. 1990). Erschwerend wirkt, dass Tumore bei Fischen auch ohne den Einfluss von Umweltverschmutzungen auftreten können (Stich et al. 1977) (z. B. durch Virenerkrankungen), und dass bei Verschmutzungs-induzierten Tumoren gar nicht immer gentoxische Komponenten für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht werden können, sondern die Ursache zum Teil auch bei verschmutzungsbedingten Entzündungsprozessen zu liegen scheint (Hayes et al. 1990).

Anhand dieser Beispiele wird bereits deutlich, dass sich Verschmutzungen auf die Population auswirken können. Zunächst ist ein Teil der Individuen z. B. durch die Entstehung von Krebs und anderen Erkrankungen betroffen. Im Falle gentoxischer Belastung kann es aber auch zu nachhaltigeren Populationseffekten kommen: Generell können genetische Veränderungen in Elternorganismen bzw. deren Keimzellen direkt an Folgegenerationen weitergegeben werden und so im Prinzip die genetische Diversität der Population beeinflussen (was sich wiederum auf die Gesundheit, die Anpassungsfähigkeit an den Lebensraum und den Fortbestand der Population auswirken kann) (s. z. B. Hoffmann 1996). Zum direkten genetischen Effekt auf Populationen, z. B. durch Keimzellschäden, kann ein allgemein für (öko)toxische Wirkungen geltender indirekter Effekt auf die Zusammensetzung des Genpools hinzukommen, dadurch, dass Selektionsdruck auf die Population ausgeübt wird, der z. B. die Entstehung von Resistenzen ermöglicht, aber auch zur genetischen Verarmung oder zum Aussterben führen kann (Würglers & Kramers 1992; Nöthel 1993; Wirgin & Waldman 1998). Ein Beispiel, bei dem ein gentoxischer Selektionsdruck (radioaktive Strahlung) zu einem Shift des Genpools einer Fischpopulation führte, sodass diese radioresistenter wurde, ist bei Theodorakis et al. (1999) zu finden. Es besteht aber die Möglichkeit, dass

Resistenzen zulasten von Genen erworben werden, die unter Normalbedingungen vorteilhaft sind.

Ebenso wie Populationen "höherer" Vielzeller sind durch gentoxische Wirkungen auch "niedere" Organismen betroffen, die sich durch Zellteilung vermehren. Die Auswirkungen von Gentoxizität auf die beiden Organismengruppen unterscheiden sich aber grundlegend: Einzeller, wie z. B. Bakterien erzeugen meist auf direktem Weg eine hohe Anzahl an Nachkommen und besitzen kurze Generationszeiten, während bei Vielzellern eine Schädigung somatischer Zellen subletal und ohne drastische Folgen für den Einzelorganismus sein kann (im Gegensatz zu Keimzellschäden, s.o.). Weitere Unterschiede sind durch die vorwiegend asexuelle Fortpflanzung bei Einzellern gegeben.

1.1.4 Gentoxische Belastungen der aquatischen Umwelt

Die Anzahl neuer Chemikalien und Zwischenprodukte aus der industriellen Produktion, die potenziell in die Umwelt - und somit auch in das Wasser - gelangen können, nimmt so stark zu, dass einige Autoren von exponentiellem Wachstum sprechen (Binetti et al. 2008). Nur ein geringerer Teil der produzierten Stoffe war zum Zeitpunkt der praktischen Arbeiten dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Toxizität untersucht (bei Ahlf et al. 1991 wurde z. B. ein Anteil von nur 1 % angenommen) (Hollert & Braunbeck 1997). Zu den bekannten gentoxischen oder karzinogenen Stoffen, die als Umweltkontaminanten vorkommen können, gehören polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) (Reichert et al. 1998; Ericson et al. 1998; Baumann 1989; Stegemann 1981; Clark & McLeod 1977), aromatische Amine (White & Rasmussen 1998; Miadokova et al. 1998), Azoverbindungen, nitroaromatische Verbindungen (Holliger et al. 1997; George et al. 1998; Hasspieler et al. 1997), Schwermetalle wie Blei, Cadmium und Arsen (Johnson 1998; Sorensen 1991; Gagné & Blaise 1995), Organochlor- und Organophosphor-Verbindungen wie PCBs (polychlorierte Biphenyle), Dioxine (z. B. TCDD; Bertazzi et al. 1998) und Pestizide wie Lindan (HCH) (Pool-Zobel et al. 1993), DDT (Vahl et al. 1997) und Carbamate. Weiterhin ist radioaktiver Fallout (z. B. ^{131}I , ^{137}Cs , ^{90}Sr , $^{239+240}\text{Pu}$, siehe z. B. Lund & Galanti 1999; Fisk & Sanderson 1999; Franic et al. 1999) zu nennen und schließlich können auch natürliche Karzinogene in das Wasser gelangen (z. B. das stark karzinogene Mykotoxin Aflatoxin B₁; Paterson et al. 1997).

Diese Stoffe können von öffentlichen Abfällen, Müllverbrennungsanlagen, Färbe-, Textil-, Lack-, Lösungsmittel- und Papierindustrie, der Erdölgewinnung, -Verarbeitung und Kraftstoffverbrennung (Verkehr), der metallverarbeitenden Industrie, aus Batterien, Streichhölzern, sowie der Pestizidanwendung (Landwirtschaft) und -herstellung, von Atomkraftwerksunfällen, aus der Arzneimittelherstellung und -Anwendung (Pharmaindustrie und Krankenhäuser), der Sprengstoffherstellung, Nuklearwaffentests und Kampfstoffen stammen (bei letzteren Punkten kann es sich um Altlasten handeln).

1.1.5 Bedeutung des Wassers und die Rolle von Fischen

Wasser stellt eine natürliche Ressource grundlegender Wichtigkeit für die menschliche Ernährung und Gesundheit dar. Durch seine besondere Mobilität (im physikalischen, geografischen, klimatischen und biologischen Sinn) stehen einerseits die unterschiedlichen Wasserkompartimente (z. B. Oberflächenwasser und Grundwasser)

und andererseits die Lebewesen einschließlich des Menschen miteinander in Verbindung. Fische repräsentieren eine Organismengruppe, die direkten Kontakt zu diesem Medium hat, zu den dort gelösten oder partikulären Verbindungen (z. B. dem Sediment) und zu den anderen Vertretern der Biozönose.

Wo Fische dem Menschen als Nahrungsmittel dienen, können Belastungen des Menschen mit gentoxischen Substanzen auftreten (Nahrungskettenanreicherung) (Shugart 1995). Wird ein gentoxischer Effekt in Fischen beobachtet, gibt dies auch Anlass zur Befürchtung gentoxischer Effekte beim Menschen. Fische sind etablierte und empfindliche Monitororganismen in der aquatischen Toxikologie. Einige kleinere Arten ("Aquarienfische") wie Zebrafisch und Reiskärpfling werden darüber hinaus zunehmend als toxikologische Modellorganismen für mutagene und cancerogene Prozesse eingesetzt. Neben diesen eher anthropozentrischen Argumenten für die Untersuchung von Fischen bestehen auch arten-, natur- und biotopschützerische Argumente.

Gesichtspunkte dieser Art schlagen sich zunehmend auch in der Gesetzgebung nieder. Die Einleitung von Schadstoffen in Gewässer in Deutschland ist im Wasserhaushaltsgesetz (WHG) geregelt. In § 7 a der alten Fassung, die zum Zeitpunkt der vorliegenden praktischen Arbeiten galt, war dort vorgeschrieben, dass die Schadstofffracht des Abwassers so gering gehalten wird, wie *"nach den allgemein anerkannten Regeln der Technik möglich ist"* (§ 57 der neuen Fassung von 2009 enthält eine entsprechende Formulierung). Dabei muss *"nach dem Stand der Technik"* auf *"gefährliche Stoffe"* geachtet werden, zu denen u.a. solche mit einer *"krebserzeugenden, fruchtschädigenden oder erbgutverändernden Wirkung"* zählen (Gesetzestext s. z. B. DIN-Taschenbuch 230, 1990). Daraus ergab sich also die Notwendigkeit, die vorhandene gentoxische Wirkung im Wasser zu prüfen. Auch die heute gültige Einstufung in Wassergefährdungsklassen nach der Verwaltungsvorschrift wassergefährdender Stoffe (VwVwS) beruht auf R- und S-Sätzen (Risk and Safety), welche wiederum auf einer Prüfung beruhen. Anmeldung und Toxizitätsprüfung von Chemikalien sind in Deutschland im Chemikaliengesetz ("Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen", ChemG) geregelt. Anmeldung und Prüfung sind abhängig von den Produktionsmengen und vom Zeitpunkt, wann die Stoffe erstmals in Verkehr gebracht wurden. Das galt zum Zeitpunkt der hier vorliegenden praktischen Arbeiten und gilt in veränderter Form auch heute, wo viele Regelungen des ChemG weggefallen sind und es in wesentlichen Teilen auf die EU-Chemikalienverordnung REACH (Verordnung (EG) Nr. 1907/2006) zurückgreift, die am 1. Juni 2007 in Kraft trat. Zu den Toxizitätsprüfungen gehörten auch Prüfungen zur Karzinogenität (Welzbacher 1998; Bliefert 1994). Die genannten gesetzlichen Regelungen wurden jedoch von vielen Fachleuten als nicht ausreichend angesehen (Hantge 1992).

Inzwischen sind, wie bereits angedeutet, viele Regelungen überarbeitet worden und neue Regelungen in Kraft getreten (Welzbacher 2007; Müller 2011). Gewissermaßen eine Revolution stellt die REACH-Verordnung dar, die das europäische Chemikalienrecht vereinfacht und harmonisiert und durch die die Erfassung und Prüfung gefährlicher Stoffe teilweise verbessert wird. Stoffe, die aufgrund geringer Produktionsmengen nicht zwingend getestet werden müssen, könnten jedoch in ungünstiger Weise vernachlässigt werden (Gundert-Remy 2008). Aufgrund der großen Anzahl zu registrierender und zu prüfender Stoffe fallen jedoch auch viele Tests und große Datenmengen an. Daher wird

auch von einigen Seiten eine Zunahme der notwendigen Tierversuche befürchtet. Vor diesem Hintergrund - und das ist wiederum eine Forderung von REACH - sollen auch alternative Testverfahren erprobt und nach Möglichkeit anstelle von Tierversuchen angewandt werden. Der hier angewandte Comet Assay *in vitro* ist ein solches Verfahren. Nach Artikel 57 der REACH-Verordnung werden Stoffe unter anderem eingeteilt in SVHC (Substances of Very High Concern, besonders besorgniserregende Stoffe), wobei es wiederum eine Unterteilung in CMR-Stoffe (Carcinogenic, Mutagenic or toxic to Reproduction) gibt (Kalberlah et al. 2011). Für diese Stoffe stellt der Comet Assay ein potenziell in Frage kommendes Testsystem dar.

1.1.6 Nachweis gentoxischer Wirkungen

Oben wurden mögliche Quellen sowie mögliche und tatsächliche Folgen gentoxischer Belastung von Gewässern und die daraus folgende Notwendigkeit, die Umwelt auf solche Belastungen zu überprüfen, genannt. Dazu sind biologische Wirkungstests geeignet. Entsprechend dem weit gefassten Begriff der Gentoxizität (s. 1.1.2) gibt es Gentoxizitätstests, die unterschiedliche Endpunkte erfassen:

- 1) Mikroskopische Erfassung von Chromosomenschäden in eukaryontischen Zellen (Aberrationstests): Bei zytogenetischen Methoden werden Chromosomenfärbungen oder -hybridisierungen vorgenommen und der Anteil von Zellen mit Euploidien, Aneuploidien, Mikronuklei, strukturellen Chromosomenaberrationen wie Schwesterchromatidaustauschen u.a. ausgezählt. Beispiele für Tests sind der Mikronukleus-Assay (MNA), der Test auf Schwesterchromatidaustausche (SCE-Test) und spezielle Anwendungen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH);
- 2) Untersuchung der phänotypischen Auswirkungen von Mutationen in Zellen oder Organismen der Folgegenerationen: Mutationstests, z. B. bakterielle Tests mit *Salmonella typhimurium* (Ames-Test) oder Tests mit höheren Organismen (z. B. *Drosophila*);
- 3) Anzeige von zellulären Folgereaktionen auf DNA-Schädigung, z. B. der DNA-Reparatur: Im UDS-Test wird der Einbau radioaktiver Nukleotide (^3H -Thymidin) während der DNA-Reparatursynthese bei Eukaryonten gemessen, beim bakteriellen SOS-Chromotest und umu-Test die Expression reparaturspezifischer Gene mit Hilfe eines Reportergens im SOS-Pathway Operon;
- 4) Messung von DNA-Strangbrüchen durch Trennung von Einzel- und Doppelstrang-DNA nach alkalischer Behandlung und/oder durch Auftrennung der DNA nach Molekulargewicht (Chromatographie, Elektrophorese) Beispiele: alkalische DNA-Entwindung, Alkalische Filterelution (AFE), DNA-Elektrophorese, Comet Assay, DNA-Präzipitation, ELISA von Einzelstrang-DNA;
- 5) Messung von DNA-Strangbrüchen in fixierten Zellen durch Einbau radioaktiver Nukleotide an Strangbruchstellen der DNA: Nick Translation Assay; auch ein ELISA-Nachweis von Einzelstrang-DNA mit Antikörpern ist möglich (aber kein etabliertes Verfahren);
- 6) Messung bestimmter DNA-Addukte durch chromatographische Auftrennung einzelner Nukleotide: ^{32}P -Postlabeling-Assay;
- 7) Direkter Nachweis bestimmter Mutationen durch DNA-Sequenzierung oder Nachweis von Mutationen gegenüber Kontrollen durch Vergleich von DNA-Bandenmustern (Fingerprints) mit Hilfe von PCR.

Neben dieser detaillierten Einteilung der Tests ist in der genetischen Toxikologie auch eine Einteilung in *Mutagenitätstests* und *Indikatortests* gebräuchlich. Die Mutagenitätstests beinhalten die Endpunkte, die Mutationen erfassen, während die Indikatortests solche Endpunkte erfassen, "*die mit der Mutationsentstehung in einem mehr oder weniger engen Zusammenhang stehen*" (Pool-Zobel 1993). Demzufolge ließen sich die oben unter 3 bis 6 aufgelisteten Tests - auch der Comet Assay gehört dazu - als Indikatortests zusammenfassen. Die unter 1 genannten zytogenetischen Methoden, die mikroskopisch sichtbare Chromosomenbrüche erfassen, lässt man am besten gesondert stehen. Sie erfassen zwar nicht Mutationen an sich, aber sie benötigen proliferierende Zellen - wie die Mutationstests -, weil der anzuzeigende Schaden sich erst sekundär bei oder nach der Zellteilung manifestiert. Man sollte also dagegen als typische Indikatortests solche sehen, die ein primäres Ereignis der DNA-Schädigung anzeigen.

Insgesamt existiert eine große Anzahl von Gentoxizitäts-Testsystemen (schon 1979 wurde von mehr als 100 berichtet: Hollstein et al. 1979). Die Systeme sind zum Teil reine *in vitro*-Tests, zum Teil können sie sowohl *in vitro* als auch zur Diagnose von *in vivo*-Expositionen nach Entnahme von Zellen (*ex vivo*) angewandt werden. *In vitro*-Tests besitzen gegenüber *in vivo*-Versuchen Vorteile methodischer, wissenschaftlicher und ethischer Natur (Segner 1998): Oft ist ein hoher Probendurchsatz in kurzer Zeit und bei relativ niedrigen Kosten möglich, und mechanistische ("Grundlagen-") Studien werden erleichtert, da komplexe Mechanismen des vollständigen Organismus wegfallen; weiterhin sind *in vitro*-Zellsysteme leichter kontrollier- und standardisierbar. Schließlich bieten *in vitro*-Systeme im Falle von tierischen Zellen den ethischen Vorteil, die Anwendung von Tierversuchen deutlich reduzieren zu können. Zur sicheren Beurteilung von Fragen der biologischen und artspezifischen Relevanz sind letztlich *in vivo*-Versuche notwendig. Im Falle von Routine-Toxizitätstests sollte es jedoch das Ziel sein, *in vivo*-Versuche auf die letzte Stufe einer Testhierarchie zu stellen (d. h. Anwendung z. B. nur bei negativen Vortests).

1.2 Zur Entstehung von DNA-Schädigungen

Schäden am DNA-Molekül im Zellkern können durch eine Vielzahl chemischer und physikalischer Einwirkungen zustande kommen. Selbst beim Endeffekt, der "DNA-Schädigung", handelt es sich nicht um einen einzigen molekular definierten Effekt. Die DNA-Schädigung kann aber im Allgemeinen auf wenige Elementarereignisse zurückgeführt werden, die in der Folge dann entweder einen weiteren DNA-Schaden (bzw. eine Veränderung) oder eine Funktionsstörung verursachen. Diese Elementarereignisse sind das Aufbrechen und der Verlust von chemischen Bindungen im DNA-Molekül oder die Reaktion mit Molekülen, sodass z. B. "fremde" Teile hinzukommen.

Ein Beispiel für eine sehr direkte Einwirkung findet man bei ionisierender Strahlung (z. B. γ -Strahlung und Röntgenstrahlung). Durch die Wechselwirkung mit dem DNA-Molekül können direkt Atombindungen aufgebrochen werden, sodass Einzel- und Doppelstrangbrüche (SSBs und DSBs) entstehen können. Es entstehen dabei mehr SSBs als DSBs (Singh et al. 1988; Lankinen et al. 1996). Neben der direkten Induktion von Strangbrüchen werden aber auch Reaktionen mit anderen Molekülen hervorgerufen, die

durch die Strahlung ionisiert oder radikalisiert worden sind und damit hochreaktiv sind. So können z. B. Quervernetzungen (Crosslinks) zwischen DNA-Molekülen und zwischen DNA und Proteinen entstehen.

Bei der gentoxischen Wirkung durch chemische Substanzen kommt es zur Reaktion dieser Stoffe mit der DNA. Solche Stoffe sind entweder unspezifisch hochreaktiv, wie z. B. Radikale oder sie besitzen eine besondere chemische Affinität zur DNA. Da das DNA-Molekül nach außen gerichtete, negative Ladungen besitzt, sind elektrophile Substanzen (mit positiven Ladungsstellen) typische gentoxische Reaktionspartner. Gentoxische Stoffe werden klassischerweise in direkte und indirekte Mutagene unterteilt: Nur direkt gentoxische Substanzen reagieren ohne weitere Reaktionsschritte unmittelbar mit der DNA. Indirekt gentoxische Stoffe durchlaufen dagegen ein oder mehrere Reaktionsschritte in der Zelle, und erst die dabei entstehenden Reaktionsprodukte ("ultimate Karzinogene") reagieren dann mit der DNA und schädigen sie. Im gentoxikologischen Sprachgebrauch kommt es aber vor, dass Substanzen als direkt gentoxisch bezeichnet werden, obwohl sie streng genommen indirekt gentoxisch sind (ein Beispiel ist das in dieser Arbeit getestete NQO). Vermutlich wird damit impliziert, dass diese Substanzen nicht über die bekanntesten und wichtigsten Stoffwechselwege - nämlich die Phase-I-Metabolisierung des sog. Fremdstoffwechsels - entstehen.

Der Fremdstoffwechsel (die *Biotransformation*) gentoxischer Substanzen spielt eine Hauptrolle bei der Aktivierung von indirekt gentoxischen Stoffen. Die Enzymsysteme dazu sind außerhalb des Zellkerns, meist im Zytoplasma oder dem endoplasmatischen Reticulum lokalisiert. Sie besitzen eine Entgiftungsfunktion (metabolische Inaktivierung), indem sie Schadstoffmoleküle wasserlöslich machen, sodass diese dann ausgeschieden werden können - besonders die Leberzellen von Vertebraten sind auf diese Entgiftung spezialisiert. Der Fremdstoffwechsel wird in zwei Phasen eingeteilt, an denen zusammenarbeitende Enzyme bzw. Enzymkomplexe beteiligt sind: Die *Phase-I-Reaktionen*, bei denen es sich häufig um Oxidationen (Hydroxylierungen) der Xenobiotika unter Verbrauch von NADPH oder NADH und O₂ handelt, werden vor allem durch das System der Mischfunktionellen Oxidasen (MFO) katalysiert, zu denen die Cytochrome P-450 (CYP450 Enzym-Superfamilie) und Flavin-enthaltende Monooxygenasen gehören. Die Enzyme sind an die Membranen des glatten endoplasmatischen Reticulums gebunden. Die *Phase II*-Enzyme sind dagegen meist zytosolisch. Als Phase II-Enzyme werden Enzyme zusammengefasst, die die Konjugation (kovalente Bindung) wasserlöslicher Gruppen (z. B. Glucuronsäure, Glutathion, Sulfat) an die in Phase I produzierten Metaboliten oder direkt an die Ausgangssubstanzen bewirken. Potenziell gentoxische Stoffe können so zwar einerseits inaktiviert werden, andererseits findet jedoch - hauptsächlich durch die Funktionalisierungsreaktionen der Phase I - eine metabolische Aktivierung einiger Stoffe zu reaktiven und/oder elektrophilen Zwischenstufen statt, die die DNA schädigen bzw. besonders leicht an sie binden (Rand 1995).

Ein weiterer allgemein verbreiteter Mechanismus gentoxischer Schädigung ist *oxidativer Stress*. Sowohl bei den beschriebenen Phase I-Oxidationen als auch bei den oxidativen Reaktionen in den Peroxisomen (die ebenfalls oft eine Detoxifizierungsfunktion haben) und den Elektronenübertragungen der Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) und weiteren metabolischen Reaktionen werden z.T. hochreaktive Zwischenprodukte

gebildet (Radikale und Stoffe mit hohem Oxidationspotenzial). Ein normalerweise kleiner Anteil dieser Zwischenprodukte kann den o.g. vorteilhaften Reaktionen entgehen und mit DNA, Proteinen, Membranen usw. in der Zelle reagieren. Die Hauptverursacher von oxidativem Stress sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS = Reactive Oxygen Species): H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} (Wasserstoffperoxid, Superoxidanion-Radikale, Hydroxylradikale). Fremdstoffe können oxidativen Stress und folglich Gentoxizität verursachen, wenn sie direkt zur übermäßigen Produktion von ROS beitragen oder aber indirekt, wenn sie mit den Enzymen reagieren, die in der Zelle Oxidationen oder eben antioxidative Abwehr katalysieren (Di Giulio et al. 1989; Vuillaume 1987; Forth et al. 1996; Alberts et al. 1994).

Hier können nun einige Beispiele für gentoxische Schädigung genannt werden: Molekulare Addukte an der DNA können z. B. durch Metabolite von B(a)P, von AAF und von NQO entstehen (die Namen der in dieser Arbeit näher behandelten Stoffe sind abgekürzt, volle Namen siehe z. B. Diskussionsteil). Alkylierungsmittel hängen einen Alkylrest an ein N- oder O-Atom der DNA-Basen. Z. B. entstehen Methylierungen durch DMNA oder MNNG oder durch Cyclophosphamid. Andere Moleküle können in den DNA-Doppelstrang interkalieren (sich dazwischen einlagern), so z. B. die DNA-Farbstoffe Ethidiumbromid und Acridin. Ionisierende Strahlung und Röntgenstrahlung verursachen DNA-Strangbrüche, ebenso können dies Radikale tun. NF und "oxidativer Stress" führen zu reaktiven Sauerstoffspezies, die eine Vielzahl von Reaktionen (Bindungsbrüche und -Additionen) verursachen können. H_2O_2 erzeugt ebenfalls Radikale und führt zu Oxidationen von DNA-Basen. DNA-Quervernetzung (Crosslinking) kann durch das Pilzgift Mitomycin C, durch Cis-Platin, durch Formaldehyd und z.T. auch durch ionisierende Strahlung entstehen. Die schädliche Wirkung von UV-Strahlung (besonders der kurzwelligen UV-C-Strahlung) beruht vor allem auf der Bildung von Pyrimidindimeren und sog. 6-4 Photoprodukten.

Schließlich gibt es noch weitere Mechanismen, die zu DNA-Strangbrüchen führen, jedoch von der eigentlichen Gentoxizität unterschieden werden müssen. Dazu gehören der "einfache" Zelltod (Nekrose) und die Apoptose (sog. programmierter oder aktiver Zelltod). Durch Zellschädigung oder Zelltod (Nekrose) werden Membranen geschädigt und verschiedene Enzyme freigesetzt, die zur Zerstückelung der DNA führen, sodass im DNA-Strangbruchtest ein positives Ergebnis entsteht (Bradley et al. 1987; Singh 2000). Da diese Strangbrüche keine primär gentoxische Ursache haben, müssen sie im Gentoxizitätstest unbedingt ausgeschlossen werden (dies geschieht z. B. durch zusätzliche Zytotoxizitätstests). Ein Sonderfall ist die Apoptose. Dieser "programmierte Zelltod" ist eine komplexe aktive Reaktion, die z. B. bei der natürlichen Embryonalentwicklung von Wirbeltieren, in der Immunreaktion (zellvermittelte Zytotoxizität) und bei Krebs auftritt (und in letzterem Fall Krebszellen vernichtet) (Wyllie 1992; Zhivotovsyky et al. 1999). Eine Folge der Apoptose ist eine enzymatische DNA-Degradation auf Nukleosomenlänge (ca. 180 bp oder Vielfache davon) durch spezifische DNAsen. Dies führt zu unzähligen Strangbrüchen, die ebenfalls in Gentoxizitätstests wie dem Comet Assay detektiert werden können. Hier kann aber nicht von Gentoxizität gesprochen werden, da die DNA nur infolge der Apoptose geschädigt wird. Dennoch ist eine Sondersituation dadurch gegeben, dass unter den Ursachen bzw. Auslösern für Apoptose (z. B. Wärme) auch gentoxische Stimuli sind (z. B. Strahlung und einige Krebs-Chemotherapeutika).

1.3 Gentoxizitäts-Biomarker und -Biomonitoring

"Biomarker sind physiologische und/oder biochemische Größen, die auf Stoffeinwirkungen oder physikalische Einflüsse reagieren und auf den verschiedenen Organisationsebenen eines Organismus [...] als Maß für die Exposition, die Wirkung oder die Empfindlichkeit quantifiziert werden können." (Definition des AK Bioindikation der GDCh 1996)

"Gentoxizität" oder "DNA-Strangbrüche" stellen also als spezifische biochemische Antworten ("Endpunkte") an sich Biomarker dar. Zum Teil wird in Definitionen auch zusätzlich betont, dass man Biomarker als Frühwarnsystem einer erst später erscheinenden pathologischen Veränderung ausnutzen kann (Di Giulio 1989, Ernst & Peterson 1994, Peakall 1992). Das ursprünglich aus der Humanmedizin kommende Biomarker-Konzept kommt seit mehreren Jahren auch in ökotoxikologischen Untersuchungen zur Anwendung.

In diesem Sinne kann man gentoxischen Stress bei Organismen zum Beispiel als Anzeiger für eine Krebsgefährdung nutzen, weil ein kausaler Zusammenhang (s. 1.1.3) zwischen Gentoxizität und Karzinogenität besteht. Die Biomarker-Funktion besteht aber auch ohne den Aspekt des Frühwarnsystems, und Gentoxizität ist über die Krebsgefährdung hinaus eine schädliche Noxe. So kann auch eine allgemeine oder möglicherweise lebensbedrohliche akute Belastung von Zellen bzw. Organismen durch gentoxische Belastung verursacht werden. Umgekehrt können allgemein toxische Belastungen gentoxisch erscheinende Reaktionen, z. B. starke Fragmentierung der DNA, auslösen, die jedoch nur noch eine späte Folge der Zellschädigung bzw. des Zelltods sind und möglichst klar von primär gentoxischen Reaktionen unterschieden werden müssen.

Ökotoxikologische Untersuchungen können, wie in der vorliegenden Arbeit, sowohl die Wirkung von Umweltproben unter Laborbedingungen, als auch Biomarker in Freilandorganismen überprüfen. In beiden Fällen wird von Biomonitoring gesprochen, mit dem Ziel der Überprüfung der Umweltqualität:

"Das Biomonitoring erlaubt mit Hilfe von Bioindikatoren eine zeitlich integrierende Kontrolle des Zustandes der belebten Umwelt. [...] Beim passiven Biomonitoring werden Einflüsse auf Bioindikatoren an ihrem natürlichen Standort untersucht, während beim aktiven Biomonitoring standardisiertes biologisches Material unter definierten Bedingungen exponiert wird." (Definition des AK Bioindikation der GDCh 1996)

Zur Vervollständigung sei hier auch noch die Definition der Bioindikation genannt:

"Unter Bioindikation versteht man den Einsatz geeigneter Indikatororganismen (Bionindikatoren), die eine qualitative und quantitative Ermittlung von charakteristischen anthropogenen und natürlichen Umwelteinflüssen ermöglichen." (Definition des AK Bioindikation der GDCh 1996)

Soweit Biomonitoring-Untersuchungen zur Gentoxizität durchgeführt wurden, wurden diese früher häufig mit der ³²P-Postlabeling-Methode (nach Randerath et al. 1981; 1989) unternommen (Reichert et al. 1998; Varanasi et al. 1989; Dunn et al. 1987; Kurelec &

Gupta 1993; Harvey et al. 1988). Mit dieser Methode ist ein sehr empfindlicher Nachweis von DNA-Addukten möglich, sie ist jedoch mit relativ großem Aufwand und radioaktiven Arbeiten verbunden. Auch andere Methoden wie der *Mikronukleus-Assay* (Al-Sabti 1992; Al-Sabti & Hardig 1990; Al-Sabti 1992; in Zusammenhang mit weiteren Biomarkern oder Pathologien: De Flora et al. 1993; Rao et al. 1997), die zytogenetische Untersuchung *chromosomaler Aberrationen (CA)* und *Schwesterchromatidaustausche (SCE)* (Ahmed et al. 1998; Humanbiomonitoring: Hartmann et al. 1998; Betti et al. 1994; Rubes et al. 1998) wurden im Biomonitoring angewandt. Der *Comet Assay*, schon häufiger im humanen Biomonitoring eingesetzt (Betti et al. 1994; Singh et al. 1990; Tice et al. 1992; Frenzilli et al. 1997; Collins et al. 1997; Hartmann et al. 1998), steht noch am Beginn im Umweltmonitoring, oft ist er dort noch in der Evaluierungsphase, wo *in vivo*-Versuche mit Standardsubstanzen eingesetzt werden (Tice 1995, Nacci et al. 1996, Wilson et al. 1998, Devaux et al. 1998, Pandrangi et al. 1995, Sasaki et al. 1997, Mitchelmore & Chipman 1998b, Verschaeve & Gilles 1995). In neuester Zeit sind weitere Untersuchungen hinzugekommen, die am Schluss dieser Arbeit diskutiert werden.

Der Comet Assay ist eine relativ neue Methode zum Nachweis des Biomarkers "Gentoxizität" und noch wenig in Biomonitoring-Untersuchungen erprobt. In vorangegangenen Untersuchungen an Säugetierzellen hat sich gezeigt, dass er relativ schnell und einfach durchführbar ist und außerdem an Zellen unterschiedlichster Herkunft angewandt werden kann, also den Einsatz derselben Nachweismethodik in unterschiedlichen biologischen Systemen erlaubt (verschiedene Organe, *in vitro* – *in vivo*, usw.) (Tice 1995). Dieses Potenzial sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft und gegebenenfalls ausgenutzt werden.

1.4 Nachweis von DNA-Schäden als DNA-Strangbrüche im Comet Assay

Der Comet Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese) ist eine Technik zum Nachweis von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen und AP-Stellen (apurinische/apyrimidinische Stellen) der DNA in eukaryontischen Zellen (Fairbairn et al. 1995). Andere Läsionen am DNA-Molekül, wie kovalente Bindung von Molekülen (Addukte, Alkylierungen) oder Pyrimidindimere und auch DNA-Quervernetzung (Crosslinking) können mit dem Comet Assay indirekt ebenfalls zum Teil angezeigt werden, da sie durch DNA-Reparatur in der Zelle vorübergehend in "Strangbrüche" überführt werden - die Quervernetzung stellt dagegen einen Sonderfall dar, der weiter unten erläutert wird. Sowohl die Mechanismen der direkten Entstehung von Strangbrüchen als auch die Mechanismen der DNA-Reparatur sind in vielen Fällen (und an Fischzellen) noch nicht generell aufgeklärt. Es handelt sich um verschiedene und komplexe Prozesse.

Auch das Prinzip des Comet Assay ist komplex und nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Wie der Comet Assay die oben genannten Schadensarten indiziert, erklärt man sich nach den bisherigen Modellen etwa folgendermaßen: Direkte DNA-Strangbrüche können beispielsweise durch Radikale (die z. B. durch H_2O_2 erzeugbar sind) oder durch ionisierende Strahlung (z. B. Röntgen- oder γ -Strahlung) entstehen. Addukte und andere DNA-Veränderungen dagegen können durch Reparaturenzyme erkannt und herausgeschnitten werden, was im Comet Assay zum gleichen Effekt führt, wie DNA-

Strangbrüche (s.u.), weil dadurch Unterbrechungen im DNA-Strang und damit DNA-Fragmente entstehen. Die enzymatischen Einschnitte werden von DNA-Endo- und Exonukleasen im Inzisions- und Exzisionsschritt der Nukleotid-Exzisionsreparatur (*Nucleotide Excision Repair* = *NER*) bzw. ähnlichen Formen der DNA-Reparatur mit Exzision und anschließendem Neueinbau von DNA-Anteilen (*Unscheduled DNA Synthesis*, *UDS*) erzeugt (Alberts et al. 1994, S. 248). AP-Stellen, die im alkalischen Comet Assay ebenfalls als Strangbrüche angezeigt werden, können durch den Zerfall instabiler Addukte und durch die Exzision einzelner DNA-Basen entstehen. Diese Basenexzision ist ein weiterer Reparaturprozess (*Base Excision Repair* = *BER*), der von der Nukleotidexzision unterschieden wird, da bei der BER nur einzelne geschädigte DNA-Basen durch DNA-Glycosylasen (Hydrolasen) herausgeschnitten werden, während es bei der NER mehrere zusammenhängende Basen sind (z. B. 27-29 Basen, Hjertvik et al. 1998). Neben AP-Stellen entstehen im Verlaufe der BER ebenso wie bei der NER Strangeinschnitte durch Endonukleasen (AP-Endonukleasen).

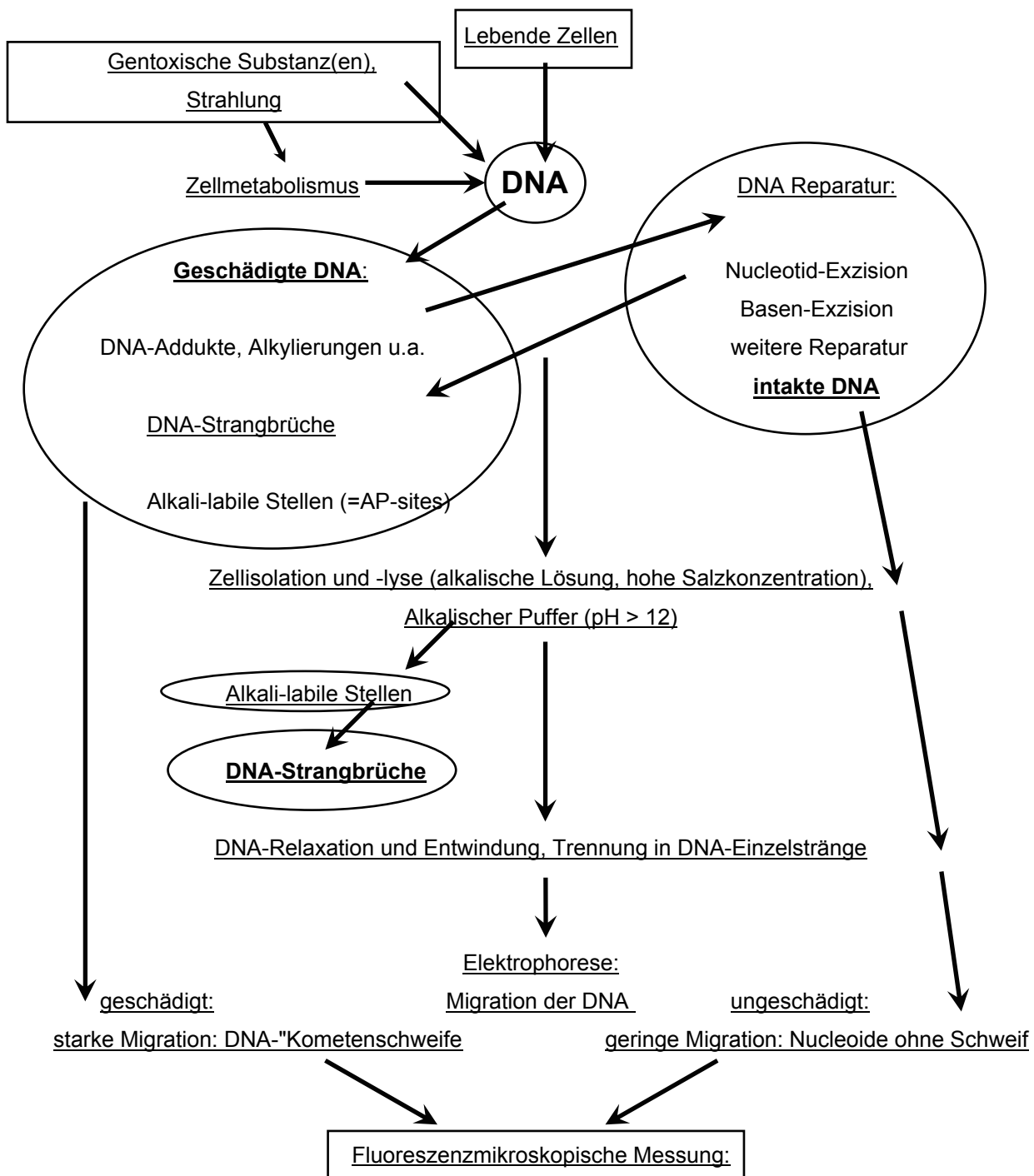
Die Indikation von DNA-Strangbrüchen im alkalischen Comet Assay beruht auf dem Prinzip, dass die DNA der Zellen zunächst durch Lyse der sonstigen Zellbestandteile freigelegt und dann im alkalischen Milieu denaturiert wird (Trennung des DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotiden) und anschließend die Fragmente unterschiedlicher Größe durch Elektrophorese im Agarosegel aufgetrennt werden (s. Abb. 1). Die vorangehende Trennung von Doppelstrang- (ds-) in Einzelstrang- (ss-) DNA während der Alkali-Behandlung ist eine Funktion der Zeit und benötigt freie DNA-Enden als Ausgangspunkte. Je mehr Strangbrüche vorhanden sind, um so mehr Startpunkte bieten sich für die Entwindung und um so schneller kann diese stattfinden. Nach ausreichend langer Entwindungszeit ist davon auszugehen, dass die DNA vollständig in Einzelstrangform vorliegt. Bei gegebener vollständiger Entwindung hängt die DNA-Migration in der Elektrophorese also theoretisch hauptsächlich von der Fragmentgröße ab. Damit würden die gleichen Prinzipien wie bei einer konventionellen DNA-Gelelektrophorese gelten, die z.T. ebenfalls als Gentoxizitätstest eingesetzt wird (Theodorakis et al. 1994). Ein wichtiger Unterschied besteht jedoch darin, dass beim Comet Assay die DNA einzelner (individueller) Zellen präpariert und getrennt mikroskopisch ausgewertet wird. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die DNA-Strangtrennung nicht vollständig ist und somit sind Ähnlichkeiten zu anderen Gentoxizitätstests gegeben, die ebenfalls den Endpunkt "DNA-Strangbrüche" detektieren, jedoch die Abhängigkeit der DNA-Entwindung von der Zeit und der Anzahl der Strangbrüche ausnutzen (alkalische Methoden detektieren ss- und ds-DNA, neutrale Entwindungen detektieren nur ds-DNA). Solche Methoden sind z. B. die alkalische Filter-Elution (AFE, Ahnström & Erixon 1973) und die alkalische DNA-Entwindungstechnik (Kanter & Schwartz 1982; Shugart 1988). Wie beim Comet Assay erfolgt bei diesen Methoden zunächst eine alkalische Behandlung, bei der sich ss- und ds-DNA trennen. Bei der AFE werden ss-DNA und ds-DNA schließlich säulenchromatographisch getrennt, während bei der alkalischen Entwindung die Unterscheidung von ss- und ds-DNA mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (z. B. Bisbenzamid = Hoechst 33528) vorgenommen wird. Beide Methoden verwenden im Gegensatz zum Comet Assay DNA, die aus vielen Zellen gewonnen wird. Durch das DNA-Pooling ist es mit diesen Methoden nicht möglich, Informationen über Subpopulationen von Zellen oder sogar einzelne Zellen zu gewinnen (Weiteres in der Diskussion).

Der Comet Assay wurde erstmals von Rydberg und Johanson (1978) und Östling u. Johanson (1984) angewandt. Diese Methode stellte eine Weiterentwicklung von Techniken dar, bei denen DNA-Strangbrüche in einzelnen Zellen noch ohne Anwendung einer Elektrophorese gemessen wurden ("Nucleoid Sedimentation": Cook et al. 1976; "Halo-Assay": Roti Roti & Wright 1987). Bei der dort angewandten neutralen Version des Comet Assay wurden vorwiegend Doppelstrangbrüche (infolge Röntgenstrahlung) detektiert. Die alkalische Version, die zusätzlich Einzelstrangbrüche erfasst, wurde von Singh et al. 1988 eingeführt.

Prinzipiell können mit dem Comet Assay beliebige eukaryontische Zellen (z. B. *in vitro*-Zellkultur oder Entnahme "*ex vivo*" aus Organismen, proliferierende und nichtproliferierende Zellen) untersucht werden. Prinzip und Methodik des Comet Assay sind in Abb. 1 dargestellt bzw. erläutert.

Abbildung 1: Funktionsprinzip des Comet Assay. Bei der Durchführung des Comet Assay werden einzelne Zellen auf Objektträgern in Agarose eingebettet und unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH} \approx 10$) und bei hoher Salzkonzentration lysiert. Im Gel verbleibt die DNA der Einzelzellen. Im alkalischen Milieu ($\text{pH} > 12,5$) erfolgt eine Trennung des DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge ("Entwindung" der DNA). Gleichzeitig werden auch AP-Stellen in Strangbrüche überführt – sie werden auch als alkali-labile Stellen bezeichnet. Durch anschließende Elektrophorese wird geschädigte DNA (mit Einzel- und Doppelstrangbrüchen) im elektrischen Feld kometenförmig in die Länge gezogen, während ungeschädigte Zellkerne als runde Nukleole bestehen bleiben (s. Abb. 4). Die Messung der "Comets" erfolgt am Fluoreszenzmikroskop. (In Abb. 1 sind Aspekte sowohl des Funktionsprinzips als auch der Methode dargestellt.)

Prinzip des Comet Assay



DNA-Migrationsstrecke (L) u. DNA-Menge (I) im Kometenschweif, Tail Moment = (L x I)

1.5 Fragestellungen, Vorgehensweisen und Begründung der Arbeit

1.5.1 Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung des Comet Assay an Fischzellen als Gentoxizitätstest im aquatischen Biomonitoring untersucht.

Dazu wurden untersucht:

1) methodische Fragestellungen:

- Übertragung des für Säugerzellen beschriebenen Protokolls auf Fischzellen als *in vitro*-Screening-Test
- Fragestellungen zu methodischen Parametern bei der Durchführung des Comet Assay: Einfluss der Elektrophorese, Einfluss der Wahl bestimmter Messparameter, Einfluss der Konzentration der zu testenden Probe, Einfluss der Expositionsdauer, Finden von geeigneten statistischen Auswerteverfahren u.a.
- Einbindung der *in vitro*-Methode mit den Fischzelllinien in eine Untersuchung mit wirkungsbezogener Fraktionierung und (chemischer) Analyse
- "Ex vivo" Anwendung der Methode an Blutzellen von freilebenden Fischen (Döbeln, *Leuciscus cephalus*) in einem Biomonitoring-Programm

2) Grundlegende Datenerhebung zum Reaktionsspektrum und für Systemvergleiche:

- Reaktion der verwendeten Zelllinien (*in vitro*-Test) auf bekannte, gentoxische Referenzchemikalien
- Reaktion der Fischzellsysteme auf Umweltproben (Oberflächenwasser, kontaminierte Wasserproben, Sedimentextrakte)

3) Zellbiologische Fragestellungen:

- Verlauf der DNA-Schädigung und DNA-Reparatur bei den untersuchten Fischzelllinien, Aspekte der metabolischen Aktivierung von DNA-Schadstoffen

4) Fragestellungen zum Einsatz des Comet Assay in Umweltuntersuchungen (Biomonitoring):

- Gentoxizität von Oberflächenwasser, kontaminierten Wasserproben und Sedimentextrakten im *in vitro*-System
- Gentoxische Belastungssituation von Fischen an verschiedenen Standorten in der Mosel

Für die *in vitro*-Versuche wurden zwei Zelltypen aus der Regenbogenforelle, *Oncorhynchus mykiss*, verwendet und z.T. miteinander verglichen: Die permanenten Zelllinien RTG-2 und RTL-W1 (abgeleitet von Gonaden- bzw. Leberzellen) (Wolf & Quimby 1962; Lee et al. 1993). Die Untersuchungen von freilebenden Fischen wurden mit dem Döbel (*Leuciscus cephalus*) durchgeführt.

1.5.2 Vorgehensweisen und Begründungen der Untersuchungen

1.5.2.1 Zur Begründung der Arbeit

Die zuvor genannten Fragestellungen sind grundsätzlich durch den Bedarf an Gentoxizitätsuntersuchungen im aquatischen Bereich begründet. Warum diese wiederum notwendig sind, geht aus den ebenfalls zuvor genannten direkten und indirekten Gefährdungen natürlicher Biozönosen und des Menschen durch gentoxische Einflüsse hervor. Diese Gefährdungen müssen messbar gemacht werden. Der Comet Assay sollte wegen seines vielversprechenden Potenzials als schneller, sensitiver, vielseitiger und kostengünstiger Test untersucht werden. Die Vielseitigkeit wurde vor allem durch die Anwendungen *in vitro* und *in vivo/ex vivo*, im aktiven (Wasserproben) und passiven (freilebende Fische) Biomonitoring erprobt. Zu Beginn der Arbeit existierten außerdem noch keine international veröffentlichten Daten zum Comet Assay an einer Fischzelllinie; inzwischen existieren neben einer eigenen Arbeit (Nehls & Segner 2001: RTG-2 u. RTL-W1) etwa zwei Arbeiten zu diesem Thema (Kammann et al. 2001 ; Kamer & Rinkevich 2002), allerdings sind diese an anderen Fischzelllinien gemacht worden (EPC-Zellen von *Cyprinus carpio* bzw. RTH-149 aus der Regenbogenforelle). Auch die Untersuchung nativer (unbehandelter) Proben mit diesem oder ähnlichen Biomarkern *in vitro* stellte eher noch eine Seltenheit dar. Der Vorteil liegt dabei darin, dass die Ergebnisse nicht durch die Probenpräparation verfälscht werden und dass ein direkter Wirkungsnachweis somit potenziell größere Sicherheit und Anerkennung erlangt, als durch indirekte Indizien erzielt werden kann. Da der Comet Assay insgesamt noch eine neue Technik darstellt, tragen weitere neue Daten an diesem Testsystem auch dazu bei, den Test mit bereits länger bestehenden Gentoxizitätstests vergleichen, bewerten und optimieren zu können.

1.5.2.2 Untersuchung methodischer Aspekte

Die oben aufgezählten methodischen Fragestellungen und Ziele wurden zunächst für den *in vitro*-Assay an den genannten Zelllinien in Angriff genommen. Dazu wurden Referenzchemikalien (Abb. 2) verwendet, für die eine gentoxische, mutagene oder karzinogene Wirkung beschrieben ist. Diese wurden einzeln getestet ("Monosubstanztest"), um eine vergleichende Auswertung zu ermöglichen. Neben der Untersuchung unterschiedlicher Substanzen an sich war es vor allem das Ziel, Orientierungswerte (Kontrollen) im Bereich negativer und positiver Testreaktionen zu erhalten. Da sich 4-Nitrochinolin-1-oxid (NQO) als hochwirksame Substanz erwies, wurde ein Großteil der Untersuchungen mit diesem Stoff durchgeführt.

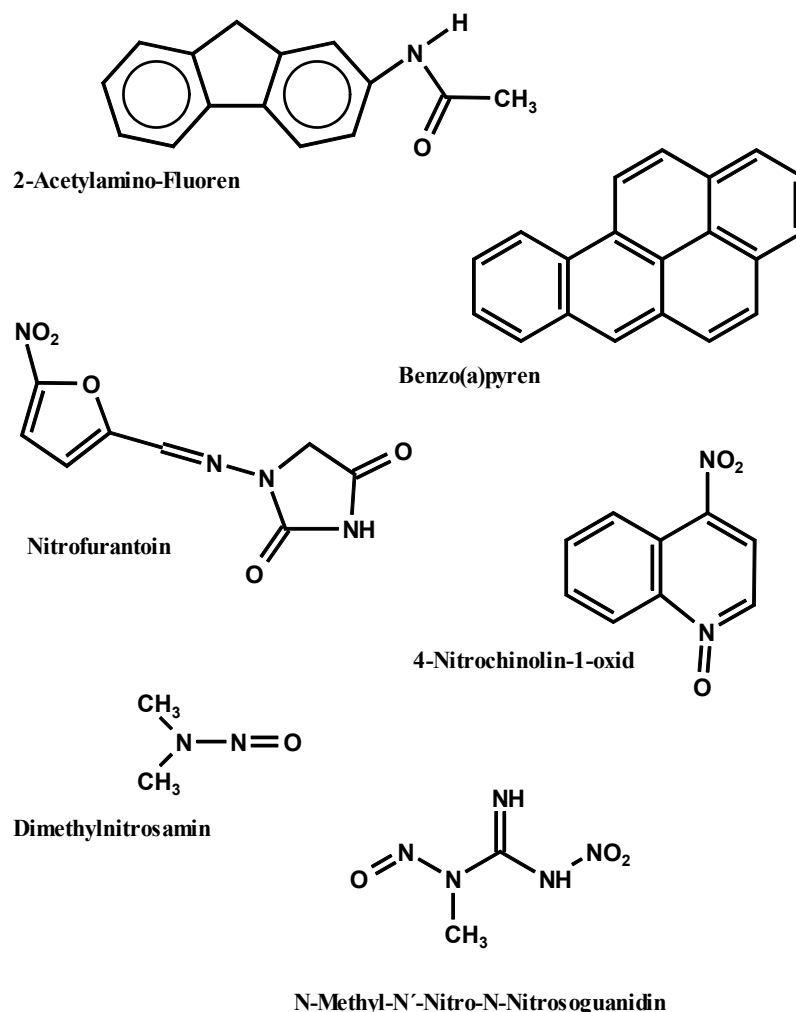


Abbildung 2: Strukturformeln der einzeln im Comet Assay getesteten Chemikalien (Einzelsubstanztest)

Die weiteren methodischen Aspekte des *in vitro*-Tests konnten daraufhin vor allem am Beispiel von NQO-behandelten RTG-2-Zellen untersucht werden. Dazu wurden sowohl Veränderungen von Versuchsparametern (z. B. Elektrophoresedauer) als auch nachträgliche statistische Auswertungen (z. B. grundlegende Beschreibung des Reaktionsverhaltens und der Variabilität, Vergleich unterschiedlicher Bildanalyseparameter) vorgenommen.

Anhand der gezielten Aufklärung des Reaktionsverhaltens und einigen methodischen Schlüsselfunktionen konnten Optimierungsansätze für das Testsystem festgestellt werden. Diese Ansätze wurden zum Teil während des Verfahrens angewandt, wobei ein Kompromiss gefunden werden musste zwischen Optimierung der Durchführung und Konstanz des Verfahrens zum Zwecke besserer Auswertbarkeit.

1.5.2.3 Verlauf von DNA-Schädigung und DNA-Reparatur in RTG-2-Zellen

Um den Comet Assay als Kurzzeit-Test einzusetzen, war eine relativ kurze Expositionszeit von 2 h geplant. Im Rahmen der Testsystemanpassung war es von Interesse, zu überprüfen, welche Expositionszeit mit dem RTG-2-Zell-System optimal geeignet war, um gentoxische Wirkung anzuzeigen. Dazu wurde anhand von

Expositionen unterschiedlicher Dauer an NQO (Expositions kinetik) der zeitliche Verlauf der DNA-Schädigung bei RTG-2-Zellen untersucht. Hier waren vor allem Unterschiede zu Säugerzellen zu erwarten, an denen der Comet Assay ursprünglich entwickelt wurde.

Neben diesem direkt angewandten Aspekt waren diese Experimente auch von grundlegenderem Interesse:

Der DNA-Schadensverlauf in der Zelle ist eine Funktion der Metabolisierung des genotoxischen Agens, der Schädigung des DNA-Moleküls an sich und der DNA-Reparatur der Zelle. Die Schadenskinetik kann also Informationen über diese Prozesse liefern. Gerade DNA-Reparaturprozesse sind ein aktuelles zellbiologisches Forschungsgebiet und für Fischzellen liegen bisher nur wenige veröffentlichte Untersuchungen vor (z. B. Walton et al. 1983). Die Kenntnis der DNA-Reparatur-Effizienz kann einen wichtigen Beitrag zur Bewertung und Abschätzung der biologischen Relevanz liefern (indem die Frage "Wie persistent sind die DNA-Schäden?" beantwortet wird). Um die Rolle der DNA-Reparatur bei RTG-2-Zellen weiter aufzuklären, wurden auch unterschiedlich lange Erholungsphasen nach der Inkubation (Post-Expositions kinetik) untersucht und Inhibitionsversuche mit Aphidicolin, einem Inhibitor der DNA-Polymerase α (Ikegami et al. 1978) durchgeführt.

1.5.2.4 Reaktion der Zelllinien RTG-2 und RTL-W1 auf Monosubstanzen

Die bereits oben erwähnten Monosubstanzen wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität und des Verlaufs der Dosis-Wirkungs-Kurven an RTG-2-Zellen, und zum Teil auch an RTL-W1-Zellen getestet. Neben den oben erwähnten Zielen der Methodenanpassung wurde so ein konkretes Schema geschaffen, das vor allem eine Basis für Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Gentoxizitätstests und anderer Labors ermöglicht. Solche Vergleiche waren z. B. innerhalb des Forschungsprojekts des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) *"Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser"* 1995-1998 in dessen Rahmen diese Arbeit angefertigt wurde, notwendig. Die Kenntnis der Sensitivitäten diente auch als Orientierung ("Eichung") für die folgenden Tests mit Umweltproben.

1.5.2.5 Testung von nativen Wasserproben an Fischzelllinien

Das übergeordnete Ziel der Untersuchungen war die Anwendung des Comet Assay zur Untersuchung von realen Umweltproben, vor allem Wasserproben (die Wichtigkeit von Wasseruntersuchungen ist oben erläutert). Testmethoden, die ohne eine vorausgehende Probenbehandlung wie Filterung, Extraktion und Aufkonzentrierung auskommen, werden hierbei besonders angestrebt, da sie praktischer sind und keine verfälschenden Einflüsse zulassen. Umweltproben stellen zudem komplexe Gemische dar, deren Wirkung meist nicht einfach aus der Wirkung der Einzelkomponenten hergeleitet werden kann. Nach der Anpassung des Testsystems mit Einzelsubstanzen wurden die Zelllinien also an verschiedene Umweltproben exponiert. Die Proben waren native (unbehandelte) Wasserproben aus den Flüssen Rhein und Elbe sowie eine Probe von einem kontaminierten Standort (Gaswerk in Düsseldorf). Diese Proben wurden im Rahmen des Forschungsprojekts des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft,

Forschung und Technologie (BMBF) "*Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser*" 1995-1998 untersucht.

1.5.2.6 Wirkungsbezogene Analytik

In der Umweltforschung ist es üblich, die Proben, die komplexe Stoffgemische aus vielen Tausenden von Stoffen darstellen, einer chemischen Analytik zu unterziehen. Dabei muss man sich bisher aus praktischen Gründen auf eine Vorauswahl von Stoffen konzentrieren, die aus den bisherigen Erfahrungen toxisch sind. Die Wahrscheinlichkeit, wirklich alle toxischen Stoffe mit darüber hinaus evtl. organismenspezifischer Wirkung zu erfassen, ist dadurch von vornherein eingeschränkt. Gegenüber neu auftretenden Kontaminationen, unbekannten Stoffen und Mischungstoxischen Effekten ist die chemische Analytik gewissermaßen "blind".

Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems ist eine wirkungsbezogene Analytik mit anschließender Evaluierung ("Toxicity Identification Evaluation" = TIE der US-amerikanischen Environmental Protection Agency, EPA: Mount 1989, Mount & Anderson-Carnahan 1989, Norberg-King et al. 1991): In Zyklen von Biotestung und Fraktionierung von Proben werden die toxischen Fraktionen immer weiter eingegrenzt, bevor eine chemische Analyse vorgenommen wird. Verdächtige Komponenten werden dann schließlich nochmals als Einzelsubstanzen dem Biotest unterzogen, um sie als Verursacher der Toxizität zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einbindung des Comet Assay in einen solchen TIE-Ansatz exemplarisch erprobt. Die untersuchte Probe stammte wiederum aus dem aquatischen Bereich: Es wurde ein Sedimentextrakt aus dem Spittelwasser untersucht, einem kleinen Fluss in der Bitterfelder Chemieregion, der bis ungefähr 1992 als "Abfluss" (Vorfluter) für Produktionsabfälle benutzt wurde.

1.5.2.7 Biomonitoring von Fischen aus der Mosel

Mit der Anwendung des Comet Assay im Biomonitoring von Fischen wurde der Schritt von der bisherigen Untersuchung *in vitro* exponierter Zellen zu *in vivo* exponierten Zellen vorgenommen. So sollte die Übertragbarkeit und Eignung der zuvor *in vitro* angewandten Methode auf die veränderten Bedingungen dieses passiven Biomonitorings (s. 1.3) geprüft werden und schließlich Ergebnisse zur gentoxischen Belastung von Fischen in einem Binnengewässer gewonnen werden. Zu diesen Fragestellungen wurde während einer Mitarbeit im Forschungsprojekt "PNETOX" in Frankreich (1998) die DNA-Schädigung in Blutzellen von 75 freilebenden Döbeln (*Leuciscus cephalus*) aus der Mosel untersucht.

1.5.2.8 Begleituntersuchungen

In die verschiedenen dargestellten Themen mussten Nebenuntersuchungen vor allem in Bezug auf zwei Bereiche einbezogen werden:

1) Damit nicht fälschlicherweise gentoxische Wirkungen interpretiert wurden, die in Wirklichkeit sekundär auf zytotoxischer Wirkung beruhten, wurden parallel zu den *in vitro*-Assays Zytotoxizitätstests durchgeführt.

2) In die Untersuchungen von Wasserproben und des Biomonitorings wurden die Ergebnisse chemischer Analytik einbezogen. Diese Ergebnisse wurden hier von anderen Labors übernommen.

2. Material und Methoden

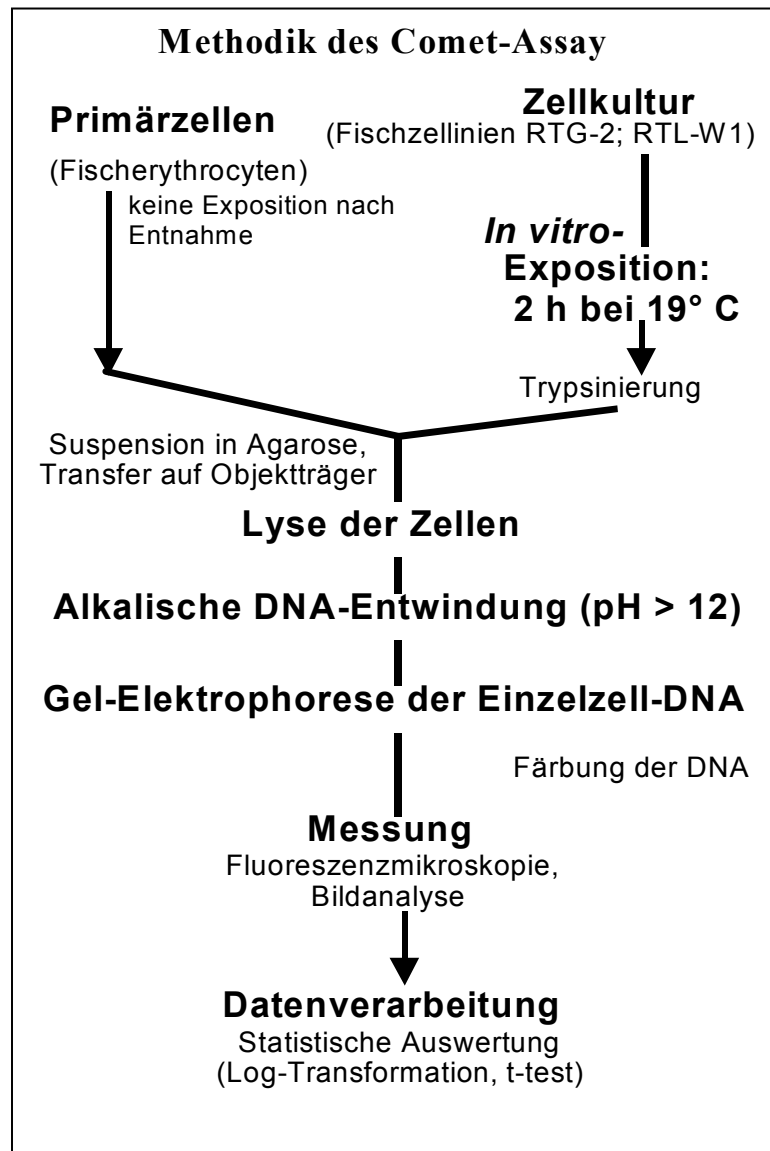


Abbildung 3: Schema der Methodik des Comet Assay mit den hier angewandten Möglichkeiten des *in vitro*-Tests mit den Fischzelllinien RTG-2 und RTL-W1 und des *ex vivo*-Tests mit Blutzellen aus Döbeln (*Leuciscus cephalus*)

Einen schematischen Überblick über den Ablauf der Methodik bietet die Abbildung 3.

2.1 Fischzellkultur und Einsaat der Zellen zur Exposition

Die aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) stammenden Zelllinien RTG-2 (Rainbow Trout Gonad; aus embryonalem Gonadengewebe) (Wolf & Quimby 1962) und RTL-W1 (Rainbow Trout Liver, Waterloo 1; aus der Leber der Regenbogenforelle) (Lee et al. 1993) wachsen adhärent. Sie wurden als Monolayer in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Nunc) in E-MEM (Earle's Minimal Essential Medium) (RTG-2) bzw. Leibovitz Medium (RTL-W1) bei 19° C im Kühlbrutschrank kultiviert (Herkunft der Zellen: 1. RTG-2:

European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, England und Deutsche Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen, DSZM, Braunschweig; 2. RTL-W1: diese Zelllinie wurde unserem Labor freundlicherweise von Dr. Nils Bols, University of Waterloo, Canada, zur Verfügung gestellt; Zusammensetzungen der Medien und Zusätze: wie unten beschrieben). Um die Zellproliferation aufrechtzuerhalten, wurden sie wöchentlich abtrypsiniert (Trypsin s.u.) und unter sterilen Bedingungen 1:2 subkultiviert. Zur Durchführung der Exposition im Comet Assay wurden die Zellen am Tag zuvor (Standardzeit 18 h) in 6-Loch-Platten (Nunc, Durchmesser pro Well: 3 cm) in einer Zelldichte von $0,056 \times 10^6$ Zellen/ml und einem Volumen von 3 ml/Well eingesät (entspricht $0,024 \times 10^6$ /cm²). Die Zellzählungen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. RTL-W1 wurden während 18 h vor der Exposition mit β -Naphthoflavon (β NF) vorinkubiert, um die Cytochrom-P4501A1-Aktivität zu induzieren bzw. zu steigern (zur Induzierbarkeit siehe 4.3.1.2). Zu diesem Zweck wurde 1/1000 einer 500 μ mol/l β NF-Lösung in DMSO bei der Einsaat in das Medium gegeben (β NF-Endkonzentration 500 nmol/l; 0,1 % DMSO).

2.2 Exposition der Zellen

Zur Exposition wurde das serumhaltige Zellkulturmedium aus den 6-Loch-Platten entfernt; die Zellen wurden zwei Mal mit je 5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen (gründliches Absaugen war notwendig, damit folgende Konzentrationen stimmten) und für 2 h (andere Expositionszeiten werden an entsprechender Stelle gesondert erwähnt) bei 19° C, 3 ml pro Well, exponiert. Das Expositionsmedium war (bei RTG-2 und RTL-W1) serumfreies E-MEM, welches kurz zuvor aus doppelt konzentriertem E-MEM entweder mit A. deion. oder bei der Testung nativer Wasserproben mit der entsprechenden Wasserprobe auf die einfache Konzentration verdünnt wurde. Das Expositionsmedium enthielt je nach Zweck entweder

- 1) die native Wasserprobe in 1:2-Verdünnung oder
- 2) die zu testende Einzelsubstanz und maximal 1 % DMSO als Lösungsvermittler (AAF, BaP, NF, NQO und MNNG wurden in DMSO vorgelöst, DMNA wurde direkt bzw. in A. dest. zugegeben) oder
- 3) 0,05; 0,2 oder 0,4 % acetonischen Sedimentextrakt oder
- 4) entsprechende Konzentrationen an Lösungsvermittlern ohne Testsubstanz als Negativkontrolle.

2.3 Durchführung der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)

Um die Exposition abzustoppen, wurde das Expositionsmedium abgesaugt, und die Zellen in jedem Well wurden je zweimal mit 5 ml kalter $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 90 μ l kalter Trypsinlösung (verschiedene Lsg. für RTG-2/RTL-W1, s.u.) vom Boden der 6-Loch-Platte abgelöst (1-5 min einwirken lassen und anschließend mehrmals mit Eppendorfpipette spülen). Die Trypsinierung wurde mit 90 μ l E-MEM mit 10 % FKS (fötales Kälberserum) abgestoppt. 10 μ l der Zellsuspension wurden entnommen und zügig mit 90 μ l LMA (Low Melting Point Agarose), die bei 35° C auf einer Heizplatte flüssig gehalten wurde, vermischt und 90 μ l dieser Zellsuspension (effektive Konzentration: 0,45 % LMA) wurden auf einen

gekühlten, mit getrockneter NMA (Normal Melting Agarose) vorbeschichteten Objektträger (OT) aufgebracht und durch Auflegen eines Deckglases (blasenfrei) zu einer dünnen Schicht ausgebreitet. Kondenswasser auf den gekühlten OT war unbedingt zu vermeiden. Die Objektträger wurden auf einer Metallplatte auf Eis einige Minuten gekühlt, bis die Agarose-/Zellschicht erstarrt war, dann wurde jeweils das Deckglas abgezogen und eine Deckschicht von 90 μ l 0,5 % NMA wurde in der gleichen Weise aufgetragen, mit einem Deckglas ausgebreitet und gekühlt. Nach Entfernen des Deckglases wurden die Objektträger in einer Färbeküvette in 4° C kalte Lyse-Lösung getaucht und 1-12 h (Standardzeit 12 h) in der Lösung im Kühlschrank (4° C, Lichtabschluss) aufbewahrt. Nach der Lyse wurden die Objektträger zur DNA-Entwindung in einer horizontalen Elektrophoresekammer dicht aneinandergelegt und 45 min in gekühlten alkalischen Elektrophoresepuffer (Zusammensetzung s.u.) gebracht (auf der "Brücke" zum Einlegen platzieren und vorsichtig eintauchen, die roten Sperrschieber herausziehen). Die Elektrophoresekammer wurde in einer Styroporkiste auf Eis gekühlt, Temperatur des Puffers: ca. 4 ° C, Lichtabschluss. Anschließend wurde für 35 min die Elektrophorese, Spannung = 25 V bzw. elektrisches Potenzial = 0,833 V/cm, durchgeführt. Die Anfangsstromstärke wurde über Regulation des Flüssigkeitspegels in der Elektrophoresekammer auf 300 mA eingestellt. Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger mit den Gelen vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entnommen ("Brücke" langsam leicht schräg herausziehen), auf einer Färbebrücke horizontal aufgereiht und zweimal mit je 2 ml 0,4 M TRIS-Puffer, pH 7,5 neutralisiert. Überschüssiger TRIS-Puffer wurde vorsichtig entfernt (die Färbebrücke wurde leicht schräg angekippt, sodass der TRIS-Puffer ablaufen konnte, die Objektträgerkante danach auf ein Papierhandtuch getupft) und die Objektträger wurden 10 min in Ethanol (100 %, mehrmals verwendbar) fixiert und entwässert, dann herausgenommen und an der Luft getrocknet. Die Objektträger konnten so bis zu einigen Wochen und länger aufbewahrt werden.

In der Regel wurden in einem Experiment 9 Proben, also 18 Objektträger bearbeitet, sodass eine Elektrophoresekammer gefüllt war. Bei kleineren oder größeren Anzahlen von Proben wurden Lücken in der/den Elektrophoresekammer/n mit unbeschichteten OTs aufgefüllt und Objektträger-Replikate wurden ggf. an homologen Stellen in zwei Elektrophoresekkammern positioniert. Bei großer Anzahl von Proben war darauf zu achten, dass die Bearbeitungszeiten bei der Herstellung der Agarosegele nicht zu lange dauerten.

2.4 Fluoreszenzmikroskopie und Bildauswertung

2.4.1 Durchführung von Fluoreszenzmikroskopie und Bildauswertung

Die getrockneten Agarosegele auf den Objektträgern wurden mit je 50 μ l Ethidiumbromidlösung (EtBr, Konz. 20 μ g/ml) angefärbt (Deckglas auflegen) und im Fluoreszenzmikroskop bei Grünanregung (Material für die Mikroskopie s.u.) betrachtet (die EtBr-gefärbten DNA-"Comets" fluoreszieren rot) und mit Hilfe des Bildanalysesystems "KOMET" Version 3.0 (Kinetic Imaging, Liverpool) ausgewertet (genaue Beschreibung siehe unten). Als Maß für die DNA-Schädigung der Zellen wurde generell die Messgröße "*Tail Moment*" verwendet (dieses entspricht in der Folgeversion der Software, "KOMET 3.1", dem "*Tail Extent Moment*"), außerdem wurden in einigen

Fällen die Größen "*Tail length*" und "*Tail DNA*" zum Vergleich herangezogen. Nach der Auswertung konnten die Deckgläser abgezogen und die OT nach erneuter Entwässerung in Alkohol wieder getrocknet und aufbewahrt werden (wobei die mit dem mutagenen Ethidiumbromid kontaminierten OT mit entsprechender Vorsicht zu behandeln waren).

In jedem Experiment wurden 100 Zellen pro Probe ausgewertet: 50 Zellen pro Objektträger (OT) und 2 OT pro Probe. Die als Excel-Datei abgespeicherten Daten wurden wie unten beschrieben (Statistik) weiterbearbeitet.

Bei der Auswahl der Zellen auf den Objektträgern wurde folgendermaßen vorgegangen: Da an den Rändern der Objektträger beim Comet Assay häufig (aus ungeklärter Ursache) Zellkerne mit geschädigter DNA auftraten, wurden nur Comets ausgewertet, die nicht in den Randbereichen (ca. 5 mm) lagen. Die Comets auf den Objektträgern wurden strichweise durch entsprechende Bewegung des Mikroskop-Objekttisches ausgewertet. Sofern keine offensichtlich abnormen Formen vorlagen, wurden alle Comets, die jeweils einzeln in das Auswertungsfenster auf dem Kameramonitor gefahren wurden, ausgewertet. Zu dicht beieinanderliegende Zellen wurden nicht ausgewertet. Fluoreszierende DNA-fremde Partikel wurden nicht in das Bildanalysefenster (einschließlich Hintergrund-Messfenster) einbezogen.

Die Messung der Comets (physikalische Größen: Länge und Intensität) wurde zügig vorgenommen, bevor zu starke Ausbleichung der Fluoreszenz eintrat. Bei der Messung wurde die Mitte des Kometenkopfes am Computerbildschirm manuell vom Auswerter bestimmt, die äußeren Begrenzungen des Kopfes wurden automatisch durch das System nach den u.a. Schwellenwerten bestimmt (durch Unzulänglichkeiten der Software ergaben sich manchmal Probleme bei der Bestimmung der Kopfmitte). Der Beginn des Kometenschweifes wurde durch "Tail from Center = ON" von der Mitte des Kometenkopfes aus automatisch gemessen. Das Schweifende wurde manuell vom Auswerter dort gesetzt, wo sich die letzten DNA-Partikel befanden, die in der Farbdarstellung auf dem Monitor eine bestimmte Farbe hatten (was einer bestimmten Fluoreszenzintensität entsprach) oder bei stark geschädigten Comets mit schwacher Intensität dort, wo noch ein Unterschied zum Hintergrund zu erkennen war (siehe Abb. 4). Auf diese Weise konnten Comets stark unterschiedlicher Schädigungsklassen ausgewertet werden, während es mit vollautomatischer Vermessung nicht möglich war, gleichzeitig sensitive Messungen bei geringen Schädigungen und wertbare Messergebnisse bei höheren Schädigungen zu erreichen.

Sämtliche von der Software bereitgestellte Messergebnisse wurden abgespeichert, zur Auswertung wurden jedoch nur "Tail Moment", "Tail Length" und "Tail DNA" (= Anteil der Fluoreszenzintensität im Schweif) herangezogen. Standardparameter war das "Tail Moment", das sich aus den beiden anderen Parametern errechnet:

$$\text{Tail Moment} = \text{Tail Length} * (\text{Tail DNA}/100)$$

Es besitzt damit die Einheit [μm].

(Das System musste für das verwendete Mikroskopobjektiv mit Hilfe eines Objektmikrometers oder statt dessen mit einer Zählkammer einmal geeicht werden. Auf

die exakte Eichung mit einem Fluoreszenzobjekt bekannter Intensitäten für die Densitometrie wurde verzichtet, jedoch wurde mit einem konstanten Wert gearbeitet. Intensität = Energie pro Zeit pro Fläche [$\text{J s}^{-1} \text{m}^{-2}$].)

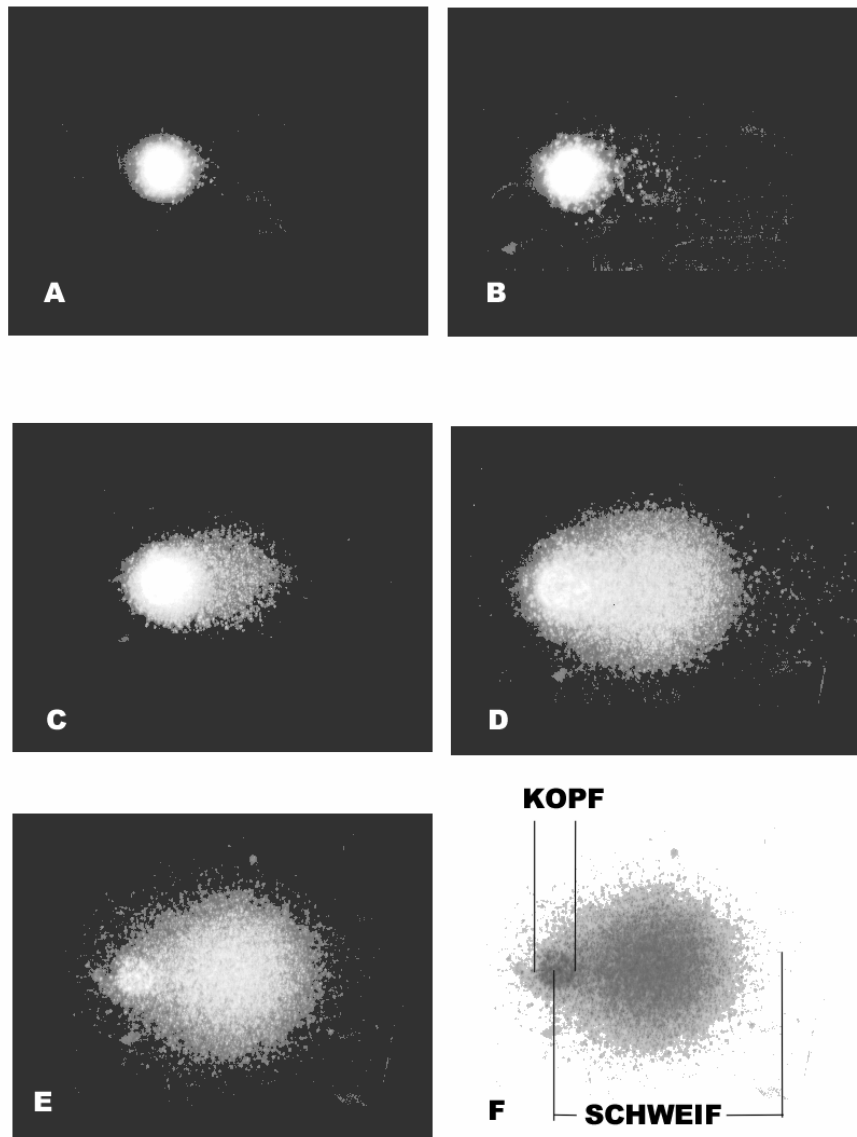


Abbildung 4: DNA-"Comets" von RTG-2-Zellen mit zunehmendem Schädigungsgrad von A nach E. Die DNA der Zellen wurde mit Ethidiumbromid angefärbt (im Original rote Fluoreszenz). Mit zunehmender DNA-Schädigung wachsen die Länge des "Kometenschweifes" und die DNA-Menge im "Schweif". In F ist dargestellt, wie ein "Comet" vermessen wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Einstellung "Schweif ab Zentrum der Zelle" gearbeitet. Während dieses Zentrum und der Beginn des Kometenkopfes automatisch festgelegt wurden, gab es beim manuell festzulegenden Ende des Schweifes einen Ermessensspielraum. Schweiflänge in F ca. 90 μm , Mikroskopie bei 400-facher Vergrößerung (dies entspricht jedoch nicht dem Maßstab auf den Fotos. Leichte Maßstabsverschiebungen der Fotos untereinander durch die fotografischen Vergrößerungsprozesse sind möglich).

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopisches Material

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Leica DM RB Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Zur Vermessung der DNA-Comets wurden ein 40x –Objektiv und 10x -

Okulare eingesetzt (vgl. Abb. 4). Zur Auswertung der Ethidiumbromid-gefärbten DNA wurde folgender Filtersatz verwendet:

a) Grünanregung für EtBr-Färbung:

Leica Filterblock N2.1:

Anregungsfilter BP 515-560 nm

Teilerspiegel RKP 580 nm

Sperrfilter LP 590 nm

Für den Zytotoxizitätstest wurde folgender Filtersatz verwendet

b) Blauanregung für FDA/EtBr-Färbung:

Leica Filterblock I3:

Anregungsfilter BP 450-490 nm

Teilerspiegel RKP 510 nm

Sperrfilter LP 515 nm

Für die lichtmikroskopische Kontrolle der Zellkulturen wurde ein Zeiss Axiovert 135 (Inversmikroskop) verwendet.

Zur Bildauswertung der Blutzellen des Döbels in Frankreich wurde ein Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop verwendet.

2.4.3 Material und Parameter bei der Bildauswertung

Die Bildanalyse wurde mit dem System KOMET 3.0 (Kinetic Imaging, Liverpool, Vertrieb: Optilas, München-Puchheim) durchgeführt, das aus folgenden Hard- und Softwarekomponenten bestand, die an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossen waren:

SW-Videokamera (Kinetic/Pulnix TM-765)

Framegrabber-Karte Matrox IP-8/AT

Computer 80486/16 MB RAM

Software KOMET 3.0

Zur Auswertung mit der Bildanalyse-Software KOMET 3.0 wurden folgende Einstellungen von Systemparametern gewählt, die eine semiautomatische Messung ermöglichen (siehe Text zur Abb. 4):

a) Menüpunkt "Comet Options":

Head Threshold:	30
Smoothing Value:	1
Interactive Length:	ON
Tail Break Length:	(Auswertung nichtautomatisch)
Tail Threshold:	(Auswertung nichtautomatisch)
Background Height:	20
Tail from Center:	ON

b) Menüpunkt "Image Grabbing":

Brightness:	27
Contrast:	63 (Maximum)
Integrations:	1
On-CCD:	ON
Accumulate:	OFF

2.5 Zeitbedarf des Tests

Der beschriebene Comet Assay mit Zellkulturzellen erforderte bei der Durchführung (ohne generelle Vorbereitungen und Zelleinsaat) insgesamt etwa 14,5 h, davon ca. 6 h Auswertung bei 18 Objektträgern (900 Zellen). Es war günstig, die Lyse der Zellen über Nacht anzusetzen, sodass am ersten Tag 5 h, am zweiten ca. 8,5 h (= 13,5 h insgesamt) benötigt wurden. Da die Gele nach der Durchführung getrocknet wurden und eine Aufbewahrung möglich war, konnte die Auswertung praktisch zu einem beliebigen Zeitpunkt vorgenommen werden. Es war dementsprechend auch möglich, die Auswertung einzelner Objektträger zeitlich zu trennen (je ca. 15 min Auswertung); dies wurde jedoch nur sehr begrenzt getan, da dadurch die Varianz möglicherweise vergrößert werden könnte (z. B. durch Abnutzung oder Austausch der Fluoreszenzlampe).

2.6 Zytotoxizitätstest mit FDA/EtBr

2.6.1 Durchführung

Nach dem Abtrypsinieren der Zellen nach der Exposition und wurden je 25 μ l Zellsuspension entnommen, auf einen Objektträger gebracht und mit 25 μ l FDA/EtBr (Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid) versetzt. Abgestorbene Zellen (mit geschädigter Zellmembran) erschienen bei Blauanregung im Fluoreszenzmikroskop rot (EtBr-Fluoreszenz), während lebende Zellen (mit intakter Membran und Esteraseaktivität) grün fluoreszierten (Dankberg & Persidsky 1976). Es wurden mindestens 250 Zellen ausgezählt und die Überlebensrate berechnet. Bei einer Überlebensrate von ≤ 70 % wurde Zytotoxizität angenommen.

2.6.2 Anmerkungen zur Zytotoxizität

Im Vorgriff auf einige Ergebnisse soll hier folgende Anmerkung gemacht werden: Der stark überwiegende Teil der in dieser Arbeit getesteten Proben wurde - bei gegebener Expositionszeit, Konzentration und Viabilitätsniveau > 70 % im FDA/EtBr-Test - als nicht zytotoxisch eingestuft. Bei $n = 111$ Proben lag das Kontrollniveau bei 92 % Viabilität, das 5 %-Quantil bei 74 % und das 95 %-Quantil bei 98 % Viabilität. Zytotoxizität wird wegen des seltenen Auftretens und vorgeschalteter Selektion daher in den folgenden Teilen der Arbeit nicht für jeden Versuch einzeln aufgeführt. In den seltenen Fällen von Zytotoxizität wird dies gesondert erwähnt. Dieser Fall war insbesondere der Sedimentextrakt F_{ges} aus dem Spittelwasser (3.5.2.2). Wurde Zytotoxizität festgestellt, dann schlug sie sich in den beobachteten Fällen meist relativ

abrupt und daher deutlich erkennbar in einer hohen DNA-Schädigung (100 % der Zellen stark geschädigt) im Gentoxizitätstest nieder.

Da nach der Exposition das Medium abgesaugt und gespült wurde, war bei der Anwendung des FDA/EtBr-Tests nicht generell auszuschließen, dass einzelne abgestorbene Zellen, die sich vom Substrat (Boden der Zellkulturplatte) und anderen Zellen gelöst hatten, nicht mehr ins Testergebnis einbezogen, d. h. nicht mitgezählt wurden. Größere Verluste von Zellen im Fall von Zytotoxizität waren aber im Normalfall zu bemerken und die Fälle von eindeutiger Zytotoxizität zeigten, dass sie trotz des Spülens nachweisbar war.

2.7 Getestete Substanzen und Proben

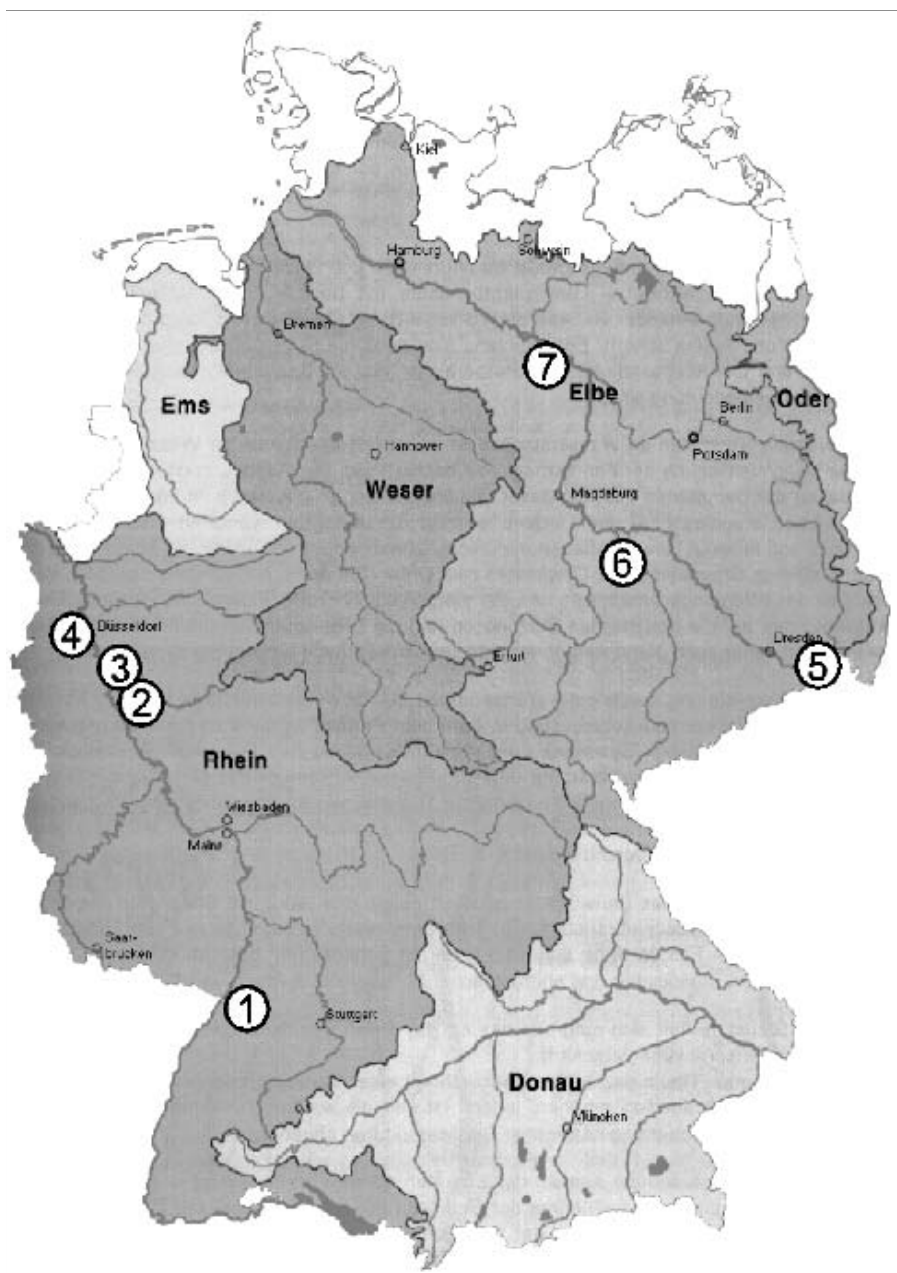
2.7.1 Testsubstanzen

- 1) N-2-Acetylaminofluoren ("AAF", CAS-Nr. 53-96-3) (Sigma, Deisenhofen, Reinheit mind. 90 %)
- 2) Benzo[a]pyren ("BaP", CAS-Nr. 50-32-8) (Sigma, Deisenhofen, Reinheit mind. 97 %)
- 3) Dimethylnitrosamin ("DMNA", CAS-Nr. 62-75-9) (Sigma, Deisenhofen)
- 4) Nitrofurantoin ("NF", CAS-Nr. 67-20-9) (Sigma, Deisenhofen, Reinheit mind. 98 %)
- 5) 4-Nitrochinolin-1-oxid ("NQO", CAS-Nr. 56-57-5) (Sigma, Deisenhofen, Reinheit mind. 98 %)
- 6) N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin ("MNNG", CAS-Nr. 70-25-7) (Serva, Heidelberg, Reinheit mind. 97 %)

AAF, BaP, NF, MNNG und NQO wurden in DMSO als Lösungsvermittler gelöst und vorverdünnt. Diese Stammlösungen wurden bei -80° C aufbewahrt und im Falle von Versuchswiederholungen wieder aufgetaut. Zur Exposition wurden die Lösungen in serumfreies Zellkulturmedium gegeben. Die DMSO-Konzentration betrug maximal 1 %. DMNA wurde direkt im Medium bzw. zuvor in A. dest. verdünnt. (Strukturformeln s. Abb. 2)

2.7.2 Wasserproben

Die Oberflächenwasserproben des BMBF-Verbundprojektes stammten aus dem Rhein (Karlsruhe, Köln, Düsseldorf), der Elbe (Schmilka, Dessau/Mulde, Schnackenburg) (s. Abb. 5) und dem Wahnachtal-Stausee (Probenahme an der Talsperre) bei Siegburg (in der Umgebung von Köln) aus den Jahren 1997 und 1998. Außerdem wurden Zusatzproben aus Schmilka, aus der Wupper und von dem stark mit BTEX-Komponenten ("Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol") kontaminierten Standort Gaswerksgelände Düsseldorf getestet. Die Proben wurden monatlich nach dem in Abb. 5 gezeigten Plan entnommen und in gekühltem Zustand zum Labor verschickt, wo sie innerhalb des folgenden Tages eintrafen. Zusätzliche Proben stammten aus der Wupper (Kohlfurter Brücke) und der Weißen Elster.



05.02.1997 Elbe
 03.03.1997 Rhein
 02.04.1997 Elbe
 12.05.1997 Rhein
 25.06.1997 Elbe
 21.07.1997 Rhein
 20.08.1997 Elbe
 29.09.1997 Rhein
 15.10.1997 Elbe
 12.11.1997 Rhein
 10.12.1997 Elbe
 07.01.1998 Rhein

Zusatzproben:
 17.02.98 Wupper
 24.03.98 Wupper
 29.04.98 Schmilka
 13.05.98 Schmilka
 16.06.98 Weiße
 Elster, dotiert

Á Karlsruhe
 ^ Wahnachtal-
 sperre
 Â Köln
 ~ Düsseldorf
 Ã Schmilka
 .. Dessau/Mulde
 Ä Schnackenburg

Abbildung 5: Lage der Probenahmestellen und Beprobungsplan für die Prüfung nativer Oberflächenwasser im BMBF-Projekt "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" (1995-1998). Mit frdl. Genehmigung von Dr. T. Grummt, UBA Bad Elster.

Von den Proben, die einen Tag nach der Probenahme im Labor eintrafen, wurden Rückstellproben abgefüllt und bei -80° C eingefroren. In der Probe enthaltene Schwebstoffe wurden durch Aufschütteln mit in das Expositionsmedium der Zellen überführt. Im Routinefall erfolgte eine 1:2 Verdünnung der Proben mit dem entsprechenden Zellkulturmedium. Die Expositionszeit betrug 2 h. Die Proben wurden in drei unabhängigen Versuchen getestet.

2.7.3 Sedimentextrakte

Aus einer Sedimentprobe des Spittelwassers, einem kleinen Fluss in der Bitterfelder Chemieregion, wurde durch Soxhlet-Extraktion (Durchführung von W. Brack, UFZ Leipzig) ein acetonischer Gesamtextrakt (F_{ges}) gewonnen, der durch Säulenchromatographie in 6 Hauptfraktionen (F1-F7) aufgetrennt wurde und diese wiederum mittels normal phase HPLC in Unterfraktionen (F1 enthielt die hydrophilsten, F7 die lipophilsten Verbindungen, Entsprechendes gilt für die Subfraktionen) (Brack et al. 1999).

Die Extrakte bzw. Fraktionen wurden in 1:1000 bis 1:250-Verdünnung (0,05; 0,2 oder 0,4 % Aceton) an RTG-2-Zellen ohne und mit S9-Aktivierung und an RTL-W1-Zellen getestet.

2.8 Chemikalien, Medien, Lösungen und weitere Materialien

2.8.1 Chemikalien für Zellkultur und Arbeiten mit Zellen

a) Medium für RTG-2-Zellen:

100 ml:

90 ml	E-MEM (Earle 's Minimal Essential Medium) mit 20 mM HEPES, Biochrom, Berlin
10 ml	FKS (fötales Kälberserum)
1 ml	L-Glutamin (Sigma) (Ausgangskonz. 200 mM)
1,2 ml	NaHCO ₃ (Biochrom) (Ausgangskonz. 7,5 % w/v)
1 ml	Neomycin (Sigma) (Ausgangskonz. 10 mg/ml)

b) Medium für RTL-W1-Zellen:

100 ml:

93 ml	L-15 Leibovitz Medium , Biochrom, Berlin
5 ml	FKS (fötales Kälberserum)
1 ml	L-Glutamin (Sigma) (Ausgangskonz. 200 mM)
1 ml	Penicillin/Streptomycin (Ausgangskonz. 10000 units/10 mg/ml)

Anmerkung: L-15 Leibovitz Medium enthält kein HEPES; stattdessen und anstelle von NaHCO₃ übernehmen L-Arginin, L-Histidin und L-Cystein zusammen mit Na₂HPO₄ die Pufferung.

c) Medium für die Exposition:

Für die Proben-Expositionen (sowohl RTG-2 als auch RTL-W1) wurde E-MEM ohne FKS und ohne Antibiotika verwendet. Dieses wurde aus Pulvermedium (Biochrom, Berlin) in doppelter Konzentration hergestellt und vor der Exposition entsprechend mit der Probe

oder A. dest. verdünnt. Im Falle der S9-Aktivierung wurde wie unten beschrieben 1:4 mit S9-Mix verdünnt.

Trypsinlösungen

a) Für RTG-2:

Trypsin/EDTA 0,05 % / 0,02 % , Biochrom, Berlin

b) Für RTL-W1:

100 mg Trypsin (EC 3.4.21.4) (Sigma, aus Rinderpankreas) auf 100 ml HBSS (Hanks balanced Salt Solution w/o Ca/Mg, Fa. Gibco BRL/Life Technologies, Paisley, Schottland)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Dulbecco 's PBS pH 7,4 (Seromed, Biochrom KG, Berlin). Ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ für Präparationsschritte, bei denen die Zellen vom Substrat und aus dem Zellverband gelöst werden sollten (bei Trypsinierung), bei allen sonstigen Schritten *mit* $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

2.8.2 Chemikalien und Material für die Einzelzell-Elektrophorese

LMA (Low Melting Point Agarose)

0,5 % LMA (SeaPlaque GTG Agarose, FMC, Biozym) wurde in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ kurz aufgekocht, in 2 ml-Eppendorfgefäße aliquotiert und bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Bei Bedarf wurde die benötigte Menge LMA im Wasserbad erhitzt und bei 35° C auf einer Heizplatte flüssig gehalten (einmalige Verwendung). Die effektiven Konzentrationen nach der Mischung mit der Zellsuspension betrugen 0,45 % NMA in der Zellschicht und 0,5 % in der Deckschicht.

Agarose-beschichtete Objektträger (OT)

1 % NMA (Normal Melting Agarose) (SeaKem HGT Agarose, FMC, Biozym) wurde in PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frei, kurz aufgekocht, dann wurden Objektträger (Fa. Menzel, mit Mattrand zur Beschriftung mit Bleistift) in die heiße NMA getaucht (bis zum Beginn des Mattrandes), die Unterseite wurde abgewischt und die Agaroseschicht 1 d getrocknet; danach konnten die Objektträger bis zur Verwendung (trocken und staubfrei) aufbewahrt werden.

Deckgläser

24 x 60 mm (Fa. Menzel)

Lyse-Lösung

0,01 M TRIS-HCl

0,1 M Na₂EDTA
2,5 M NaCl (Merck, Darmstadt)
1 % Na-Sarcosinat

Diese Lösung wurde mit NaOH-Plättchen (Merck, Darmstadt) auf pH 10 eingestellt (NaOH-Zugabe erleichtert das Lösen). Kurz vor der Verwendung wurden 1 % Triton-X 100 und 10 % DMSO zugegeben und auf 4° C gekühlt.

Puffer für die alkalische DNA-Entwindung und die Elektrophorese

Alkalischer Elektrophoresepuffer: 300 mM NaOH / 1mM Na₂EDTA. Für eine Kammerfüllung 2100 ml frisch aus Stammlösungen herstellen:

10,5 ml Na₂EDTA-Stamm (200 mM Na₂EDTA) plus 63 ml NaOH-Stamm, auffüllen auf 2100 ml mit A. dest. (pH > 12,5)

Neutralisationspuffer

0,4 M TRIS, pH 7,5

DNA-Floureszenzfärbung

20 µg/ml Ethidiumbromidlösung (EtBr)

Elektrophoresekammer

Horizontale Elektrophoresekammer (Renner GmbH, Dannstadt) 30 cm Elektrodenabstand, innen 18 cm Breite. Der Deckel wurde mit einer Bohrung für eine Pipette versehen, um das Einstellen der Stromstärke über den Flüssigkeitspegel zu erleichtern.

2.8.3 Chemikalien für den Zytotoxizitätstest

Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid-Lösung für den Zytotoxizitätstest

30 µg/ml / 8 µg/ml FDA/EtBr aus Stammlösungen jedes Mal frisch ansetzen:

FDA-Stamm	5 mg/ml Aceton
EtBr-Stamm	200 µg/ml PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺

FDA/EtBr 30 µl FDA-Stamm + 200 µl EtBr-Stamm + 4,8 ml PBS

2.8.4 Rattenleber-S9-Mix

Phenobarbital-β-Naphthoflavon (PB-βNF)-induzierter S9 (9000 g-Überstand aus Rattenleberhomogenat) von CCR, Roßdorf, Lot 120496, Proteingehalt: 24,4 mg Protein/ml (Lagerung bei -80° C, einmalige Verwendung!) wurde wie folgend zu einem 1 %igen S9-Mix angesetzt:

Für den Comet Assay wurden die Komponenten A-D (Stammlösungen) aus einem Versuchskit für den SOS-Chromotest, Fa. EBPI (14 Abacus Rd, Brampton, Ontario, Canada. Siehe auch Fish et al. 1987; Quillardet et al. 1982) im folgend dargestellten Verhältnis gemischt; der S9 aus dem Testkit wurde nicht verwendet, sondern wie beschrieben von CCR, Roßdorf, bezogen.

Komponente	Konzentration	Mischungsvolumina
A: MgCl ₂	1,65 mol/l	0,1 ml
A: KCl	0,4 mol/l	s.o.
B: Glu-6-P	0,5 mol/l	0,05 ml
C: NADP	0,1 mol/l	0,1 ml
D: TRIS-HCl pH 7,4	0,2 mol/l	2,5 ml
Aqua dest.		2,05 ml
S9 (CCR Roßdorf)	24,4 mg Prot/ml	0,2 ml
Gesamt:		5 ml

Von diesem Ansatz wurde eine 1:4-Mischung mit S9 und serumfreiem Medium (E-MEM, s.o.) zu folgenden Endkonzentrationen für die Exposition hergestellt:

8,25 mmol/l MgCl₂
 2 mmol/l KCl
 1,25 mmol/l Glu-6-P
 0,5 mmol/l NADP
 25 mmol/l TRIS/HCl
 1 % S9 = 0,244 mg Prot./ml

(Glu-6-P = Glucose-6-Phosphat)

2.9 Statistik

2.9.1 Datenbearbeitung und -bewertung

Für jede Probe/Konzentration wurden zwei Objektträger (OT) angefertigt, und pro OT wurden 50 Zellen ausgewertet, also 100 Zellen pro Probe. Da die Werte nicht normalverteilt sind, diente der Median (= 50 % -Quantil) aus den 100 Messwerten (i.d.R. Tail Moment) als Kenngröße einer Probe, außerdem wurde die Verteilung der Daten meist durch Angabe der 25- und 75 % - Quantile sowie der 10- und 90 % - Quantile in Boxplots dargestellt. Um signifikante Abweichungen von der Negativkontrolle in einem ***Einzelsversuch*** festzustellen, wurde eine Variante des t-Tests durchgeführt, die im BMBF-Verbundprojekt "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" (1995-1998) von den Statistikern B. Schneider (Medizinische Hochschule Hannover) und F. Moldenhauer (ZEBET Berlin) entwickelt wurde:

Die Tail-Moment-Daten wurden log-transformiert, sodass eine Normalverteilung angenommen werden konnte. Der Delogarithmus des Mittelwerts μ_{\log} dieser Daten (d. h.

die Größe 10^{sig} ist das geometrische Mittel der Tail Moments. Im t-Test wurde geprüft, ob der Quotient aus

geometrisches Mittel Tail Moment Probe

geometrisches Mittel Tail Moment Negativkontrolle

größer als ein Signifikanzfaktor war, der aus den 100 Werten für die gewählte Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 2,5 \%$ (einseitig) berechnet wurde. Die Berechnung dieses Signifikanzfaktors, sigf, wurde mit Hilfe von Excel 5.0-Vorlagen und –Makros (Visual Basic for Excel-Programmierung) durchgeführt, die von F. Moldenhauer in Zusammenarbeit mit den Projekt-Arbeitsgruppen erstellt wurden (Excel-Vorlage "comvorl5.xls" und Excel-Makro "sfco2ufz.xls").

Der Signifikanzfaktor, sigf, errechnet sich wie folgt:

s^2 = Varianz

n, m = Anzahl der Werte (Zellen) in Probe bzw. Negativkontrolle

t = t-Wert (siehe entsprechende Tabellen)

FG = Freiheitsgrade

lsd = "least significant difference"

$$lsd = 2 \cdot s_{\log Diff} = 2 \cdot \sqrt{\frac{s_{\log Probe}^2 + s_{\log Kontrolle}^2}{100}}$$

Diese Formel entspricht einer Näherung bei 100 Zellen pro Probe, sodass t-Wert und Freiheitsgrad nicht extra ermittelt werden müssen. Weicht die Anzahl an Zellen in einer der beiden zu vergleichenden Proben von 100 ab (dies war jedoch nicht der Fall), so berechnet sich lsd nach

$$lsd = t_{\alpha=0.025; FG=n+m-2; \text{einseitig}} \times \sqrt{\frac{s_{\log(Probe)}^2(n-1) + s_{\log(Kontrolle)}^2(m-1)}{n+m-2} \cdot \frac{n \cdot m}{n+m}}$$

und

$$sigf = 10^{lsd}.$$

Dieser Signifikanztest wurde jeweils für alle Proben zum Vergleich mit der jeweiligen Negativkontrolle des jeweiligen Einzelversuchs durchgeführt. Für die Beurteilung der nativen Wasserproben des BMBF-Gentoxizitätsprojektes wurde ein weitergehendes Verfahren angewandt, das ein versuchsübergreifendes statistisches Signifikanzkriterium beinhaltet und außerdem die Durchführung von drei unabhängigen Einzelversuchen (an verschiedenen Versuchstagen) erforderte:

Das **versuchsübergreifende Signifikanzkriterium** bezog die Streuungen der Gesamtheit der Versuche ein und diente dazu, Versuchsergebnisse auszusondern, deren o.g. Verhältnis Probe/Kontrolle zwar im Einzelversuch signifikant erhöht war, aber im üblichen (erfahrungsgemäßen) Streuungsbereich der Experimente lag (Vermeidung falsch positiver Ergebnisse). Das Kriterium war, dass der oben genannte Quotient Probe/Kontrolle das 95 %-Quantil der Signifikanzfaktoren aller hier gemessenen Wasserproben überschreiten musste. Es wird damit klar, dass diese Messwerte eine "**historische Kontrolle**" darstellen, die zudem für jedes Labor - im BMBF-Gentoxizitätsprojekt - spezifisch war. Für jedes Labor ergab sich also ein anderer Wert für das genannte 95 %-Quantil, obwohl die gleichen Proben getestet wurden.

Dieser Wert war für das UFZ Leipzig

$$P_{95\%}(SF) = 1,43.$$

Hatte also die Probe ein $\geq 1,43$ -faches Tail Moment gegenüber der Kontrolle - jeweils ausgedrückt als geometrisches Mittel - war die zweite Bedingung für eine positive Probe erfüllt..

Der Wert wurde von den Biometrikern des Projekts aus 190 Werten der Versuche errechnet. (Insgesamt sind 49 Wasserproben, 17 Negativkontrollen und 17 Positivkontrollen in jeweils drei Versuchsdurchgängen getestet worden.)

Die **dritte Bedingung** zur Bewertung einer Wasserprobe als gentoxisch war, dass mindestens zwei der drei Einzeltests (Versuchsdurchgänge) einer Probe die o.g. Bedingungen erfüllten, anderenfalls wurde das Ergebnis als negativ gewertet.

Die drei zu erfüllenden Bedingungen, um eine Wasserprobe als positiv gentoxisch einzustufen, sind hier also noch einmal zusammengefasst (gm = geometrisches Mittel):

<u>Dreistufiges biometrisches Bewertungsverfahren für Wasserproben:</u>		
1. Stufe:	$\frac{\text{gm(Probe)}}{\text{gm(NegK)}}$	$> \text{Tages-SF}$
2. Stufe:	$\frac{\text{gm(Probe)}}{\text{gm(NegK)}}$	$\geq \text{Versuchsübergreifender SF}$ (95 % Quantil (UFZ) = 1,43)
3. Stufe:	Zwei von drei Versuchen positiv	

2.9.2 Graphische Darstellung von Versuchsergebnissen als Boxplots

Im Folgenden sind die Versuchsergebnisse häufig als Boxplots dargestellt. Diese enthalten Informationen über die Häufigkeitsverteilung der Einzelzell-Messwerte: In einer "Box" sind Medianwert, 25- und 75 %-Quantile sowie 10- und 90 %-Quantile des Tail Moments aus 100 Messwerten dargestellt. Das Histogramm (Abb. 6) und der Boxplot (Abb. 7) zeigen dieselbe Dosis-Wirkungs-Beziehung für NQO an RTG-2-Zellen zur Veranschaulichung.

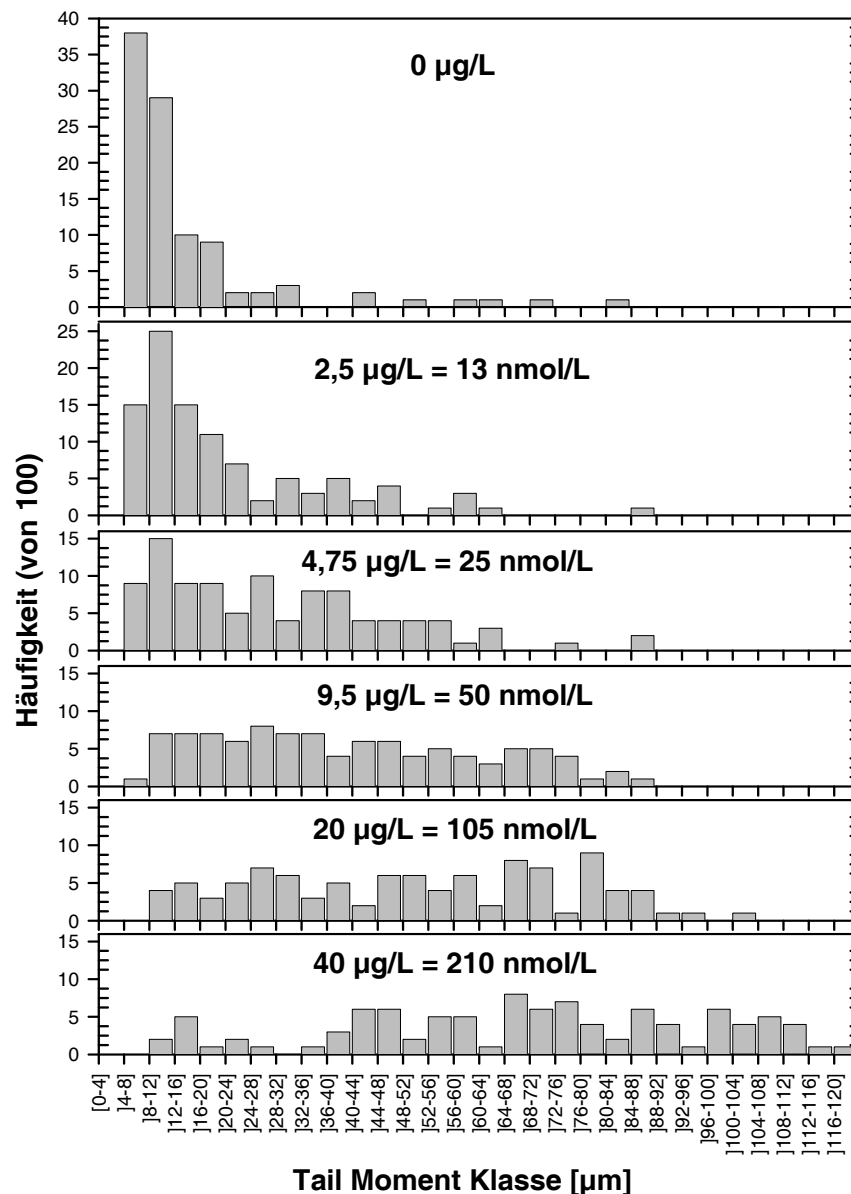


Abbildung 6: Histogramm zur Dosis-Wirkungs-Beziehung des gentoxischen Effekts von NQO an RTG-2-Zellen im Comet Assay (gleiche Daten wie Abb. 7)

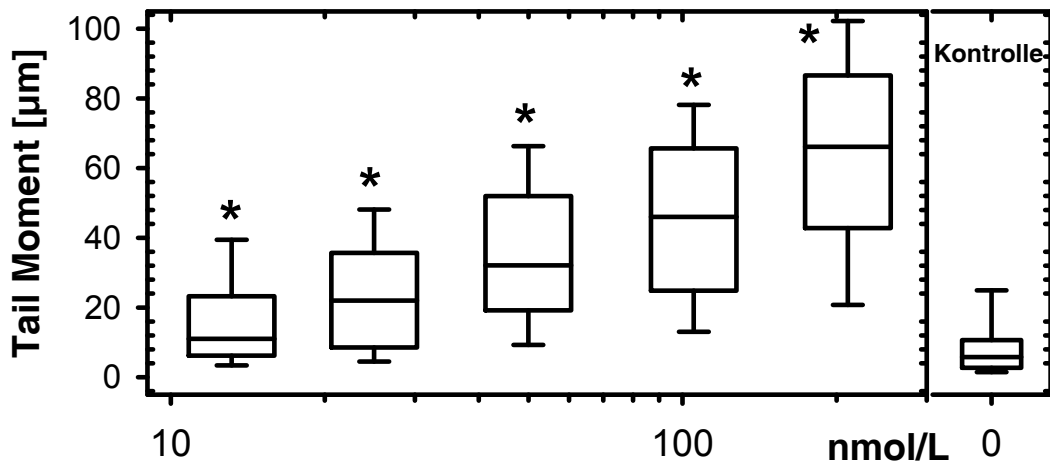


Abbildung 7: Boxplot zur Dosis-Wirkungs-Beziehung des gentoxischen Effekts von NQO an RTG-2-Zellen im Comet Assay (gleiche Daten wie Abb. 6)

2.10 Methodik beim Biomonitoring von Fischen aus der Mosel

Im Rahmen des Forschungsprojekts "PNETOX" in Frankreich (1998) wurden Blutproben von freilebenden Döbeln (*Leuciscus cephalus*) aus der Mosel genommen.

Das Biomonitoring der Fische unterschiedlichen Alters und Geschlechts erfolgte an 4 Probenahmeorten an der Mosel:

- 15.06.1998 Velle s/Moselle (20 Fische)
- 16.06.1998 Igney (20 Fische)
- 17.06.1998 Archettes (15 Fische)
- 18.06.1998 Eloyes (20 Fische)

Die Fische wurden durch Elektrofischen gefangen und nach einer Erholungszeit durch einen Schlag auf den Kopf getötet; die Blutabnahme erfolgte aus der Caudalvene. Jedem Fisch wurden 0,1-1,0 ml Blut mit heparinisierter (5000 u Heparin/ml PBS) Kanüle und Spritze entnommen und in ein heparinisiertes Eppendorf-Gefäß gegeben und bis zur Verarbeitung im Labor gekühlt.

Die Blutproben wurden mit PBS auf ca. 7×10^5 Zellen/ml verdünnt und 1:1 mit 1 % LMA verdünnt (Endkonzentration 0,5 %) und auf die Objektträger aufgetragen. Der Comet Assay wurde mit einigen Abwandlungen und unter anderen Laborbedingungen gegenüber der für die Fischzelllinien beschriebenen Methode (s.o.) durchgeführt. Die Präparation fand in einem provisorischen Labor in der Nähe der Probenahmestellen statt. Die getrockneten Objektträger konnten dann später zur Auswertung problemlos ins Heimlabor transportiert werden. Die Bildauswertung fand an einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop und dem Bildauswertungs-System KOMET 3.1 (Kinetic Imaging, Liverpool - bei den *in vitro*-Versuchen mit Zelllinien wurde die Vorgängerversion

benutzt, s.o.) bei anderen Einstellungen der Parameter als für die Zelllinien beschrieben - z. B. mit automatischer Messung der Comets - statt.

Zur statistischen Auswertung wurden Medianwerte aus 100 Zellen pro Fisch bestimmt, die Medianwerte, die je einen Fisch repräsentierten, wurden in je einer Gruppe für jede Messstation zusammengefasst und miteinander auf signifikante Unterschiede verglichen. Dazu wurden mit Hilfe der Statistiksoftware SigmaStat, Version 2.0 (Fa. Jandel Scientific) ein "Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks" und eine "All Pairwise multiple Comparison nach Dunn" durchgeführt. Es wurden weitere statistische Berechnungen bzw. Tests auf Signifikanz durchgeführt; diese sind im Ergebnisteil an entsprechender Stelle bezeichnet. Diese Berechnungen wurden ebenfalls mit dem Programm SigmaStat durchgeführt.

Nach der Blutentnahme für den Comet Assay wurde das Geschlecht der Fische bestimmt (Gonadenentnahme) und verschiedene physiologische Parameter der Fische gemessen, z. B. die Körperlänge, das Körpergewicht und das Gewicht von Gonaden und Leber. Außerdem wurden Proben von Leber und Muskel zur Bestimmung der Biomarker EROD-Aktivität (Leber) sowie AChE-Aktivität (Muskel) entnommen, z.T. homogenisiert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Diese Arbeiten wurden von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Auswertung und Vergleich der Ergebnisse vorgenommen, um sie zu den Gentoxizitäts-Ergebnissen in Beziehung zu setzen.

3. Ergebnisse

3.1 Methodische Aspekte

3.1.1 Welche methodischen Faktoren beeinflussen das Testergebnis im Comet Assay?

Das Testsystem als Ganzes musste entsprechend der Zielstellung - Verwendung als Gentoxizitätstest - angepasst werden. Dazu war eine Identifikation und Untersuchung wichtiger Einflussfaktoren nötig. Die das Testsystem beeinflussenden Faktoren können in verschiedene Kategorien eingeteilt werden, z. B. in biotische und abiotische. Eine weitere mögliche Einteilung ist die folgende: 1) Labor- und Kulturfaktoren (abiotisch-physikochemisch), 2) Probenfaktoren (abiotisch, hauptsächlich chemisch) und 3) zellbiologische Faktoren (biochemisch/biotisch).

In der vorliegenden Arbeit wurden einige der methodischen Faktoren untersucht, die einen ausschlaggebenden Einfluss auf das Versuchsergebnis erwarten ließen, wobei diese den drei oben genannten Kategorien zugeordnet werden könnten:

- die Dauer der Elektrophorese (physikochemisch)
- die Konzentration des gentoxischen Stoffes in der Probe (hauptsächlich chemisch)
- die Dauer der Exposition der Zellen an die Probe (Zeit als physikalische Größe ist hier sicher kein direkt wirkender Faktor, vielmehr sind die während dieser Zeit stattfindenden biochemisch-zellbiologischen Prozesse von Bedeutung für die spätere Aussage der Experimente).

Die unterschiedlichen anderen Faktoren, die außerdem in dieser Arbeit untersucht wurden, besitzen einen weniger ausschlaggebenden Einfluss auf das Testergebnis, sind jedoch beispielsweise für die Praktikabilität, die Sensitivität oder die statistische Auswertung des Tests von Bedeutung.

3.1.2 Elektrophoresedauer

In der Methodik der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) sind die Elektrophoresedauer und -Spannung zwei der Faktoren, die die DNA-Wanderung aus den Nukleoiden im Gel in Richtung der Anode bestimmen und ermöglichen. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern aufgrund des elektrischen Feldes im Agarosegel und können um so längere Migrationsstrecken zurücklegen, je länger die Spannung anliegt. Daneben wird die DNA-Migration von weiteren Faktoren bestimmt, die hier jedoch nicht genauer untersucht, sondern konstant gehalten wurden. Diese Faktoren sind: pH-Wert, Dauer der alkalischen DNA-Entwindung und Konzentration des Agarosegels. Dass diese Faktoren nicht genauer untersucht wurden, hat z.T. praktische Gründe, teilweise wurde auch eine nicht so große Effektivität bei ihnen vermutet. Z. B. wirkt sich eine Verringerung der Agarosekonzentration negativ auf die ohnehin heikle Stabilität der Gele auf den Objektträgern aus, und bei der alkalischen Entwindungsdauer wurde versucht, mit der gewählten Dauer von 45 min einen recht vollständigen

Entwindungsgrad bei gleichzeitig möglichst kurzer Testdurchführungszeit zu erreichen. In frühen Experimenten wurde mit einer Entwindungsdauer von nur 20 min gearbeitet, die dann aufgrund von Hinweisen in der Literatur erhöht wurde (siehe Diskussion, 4.1.2). Auf einige Literaturdaten wird in der Diskussion eingegangen. Literaturdaten weisen ebenfalls darauf hin, dass eine Erhöhung der Elektrophoresespannung nur begrenzt möglich ist, bevor die empfindlichen (Low-Melting-) Agarosegele Schaden nehmen (s. 4.1.3.1), denn die Effekte einer Spannungserhöhung wären auch eine höhere Stromstärke (bei entsprechendem Flüssigkeitspegel) und eine stärkere Erwärmung.

Im Folgenden wird also der Einfluss der Elektrophoresedauer untersucht: Ein Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Elektrophoresedauern von 20 und 35 min ergab eine größere Steigung der NQO-Dosis-Wirkungskurve bei 35 gegenüber 20 min Elektrophoresedauer (Steigung $m = 1,49$ gegenüber $0,58 \mu\text{m}/(\mu\text{g}/\text{l})$) (Abb. 8). Somit wurde durch längere Elektrophoresezeit die Auflösung erhöht, Effekte und Effektunterschiede wurden leichter detektierbar. Die Signifikanzdaten der hier verarbeiteten 6 Versuche ließen aber keinen Rückschluss auf eine Senkung der Nachweisgrenze (s. 3.2.3.3) bei erhöhter Elektrophoresedauer zu. Durch die Annäherung der Regressionsgeraden im Ursprung in diesem niedrigen Konzentrationsbereich wurde deutlich, dass eine solche Sensitivitätssteigerung absolut gesehen auch nur gering ausfallen würde. Wie weiter unten gezeigt, waren LOECs bis hinab zu $2,5 \mu\text{g}/\text{l}$ NQO bei 35 min Elektrophorese möglich.

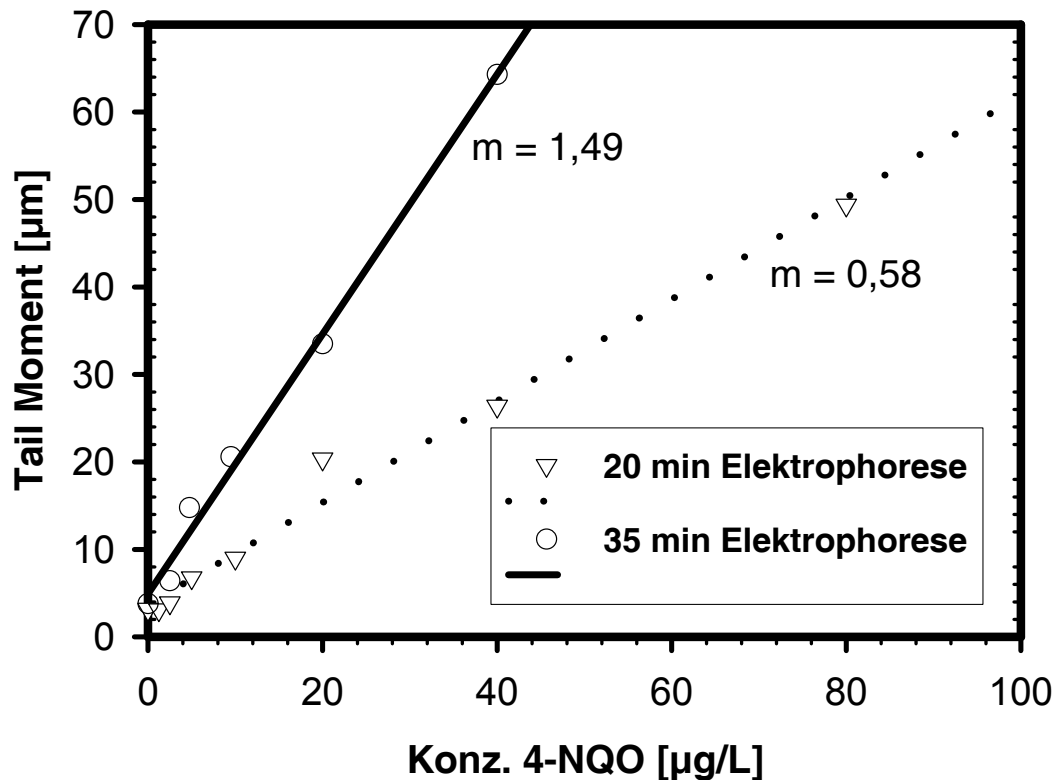


Abbildung 8: Einfluss der Elektrophoresedauer im Comet Assay an RTG-2-Zellen, 2 h Exposition an 4-NQO (gemittelte Werte aus 3 Versuchen)

3.1.3 Bildanalyse: Vergleich unterschiedlicher Parameter

Ein weiterer Faktor, der das Ergebnis beeinflussen kann, ist die Auswerteweise. Hier wurde mit einem Bildanalyseprogramm (Bildanalysesystem "KOMET 3.0", Kinetic Imaging) gearbeitet, das eine Reihe von Messparametern liefert. Es wurden drei der Bildanalyse-Parameter, "Tail Moment", "Tail Length" und "Tail DNA" untersucht, um deren Vor- und Nachteile abwägen zu können und den bestgeeigneten Parameter zu finden.

1) Der Parameter "Tail Length" ist ein Längenmaß: Hier wurde die DNA-Migrationsstrecke in μm als Distanz zwischen der Mitte des "Kometenkopfes" und dem Ende des "Kometenschweif" gemessen. "Kopfmitte" und "Schweifende" wurden mit Hilfe des Bildauswertesystems semiautomatisch bestimmt (s. 2.4).

2) Der Parameter "Tail DNA" gibt die Menge der DNA im Schweif als Anteil an der Gesamt-DNA an; er wird durch das Bildauswertungsprogramm aus den von der Videokamera gemessenen Fluoreszenzintensitäten berechnet:

$$[\% \text{ Schweif-DNA}] = [\% \text{ Gesamt-DNA}] - [\% \text{ Kopf-DNA}].$$

3) Das "Tail Moment" setzt sich als Produkt aus den beiden Parametern zusammen (s. 2.4). Die Einheit ist daher μm .

Die drei Parameter wurden anhand der Daten aus 11 Dosis-Wirkungs-Versuchen (s. auch Tab. 9) mit RTG-2-Zellen und NQO miteinander verglichen. Für die Parameter Tail Moment und Tail DNA konnten über den getesteten Bereich jeweils lineare Beziehungen in Abhängigkeit zur NQO-Dosis (Abb. 9a; 9c) zugrundegelegt werden. Die lineare Regression war zwar statistisch signifikant, jedoch waren im unteren Dosisbereich leichte Abweichungen festzustellen. Dies zeigt sich auch anhand des Vergleichs der Nullwerte der Regression mit den gemessenen Negativkontrollwerten:

	Nullwert der Regression:	Median der Negativkontrolle:
Tail Moment:	7,32 μm	4,39 μm
Tail DNA:	23,98 %	16,35 %

Die Tail Length verhielt sich dagegen nichtlinear: Nach einem steilen Anstieg im unteren Dosisbereich erreichte sie ein Maximum (Abb. 9b). Die Übereinstimmung der exponentiellen Regressions-*Kurve* mit den gemessenen Werten war auch im unteren Dosisbereich gut:

	Nullwert der exponentiellen Regression:	Median der Negativkontrolle:
Tail Length:	22,19 μm	22,94 μm

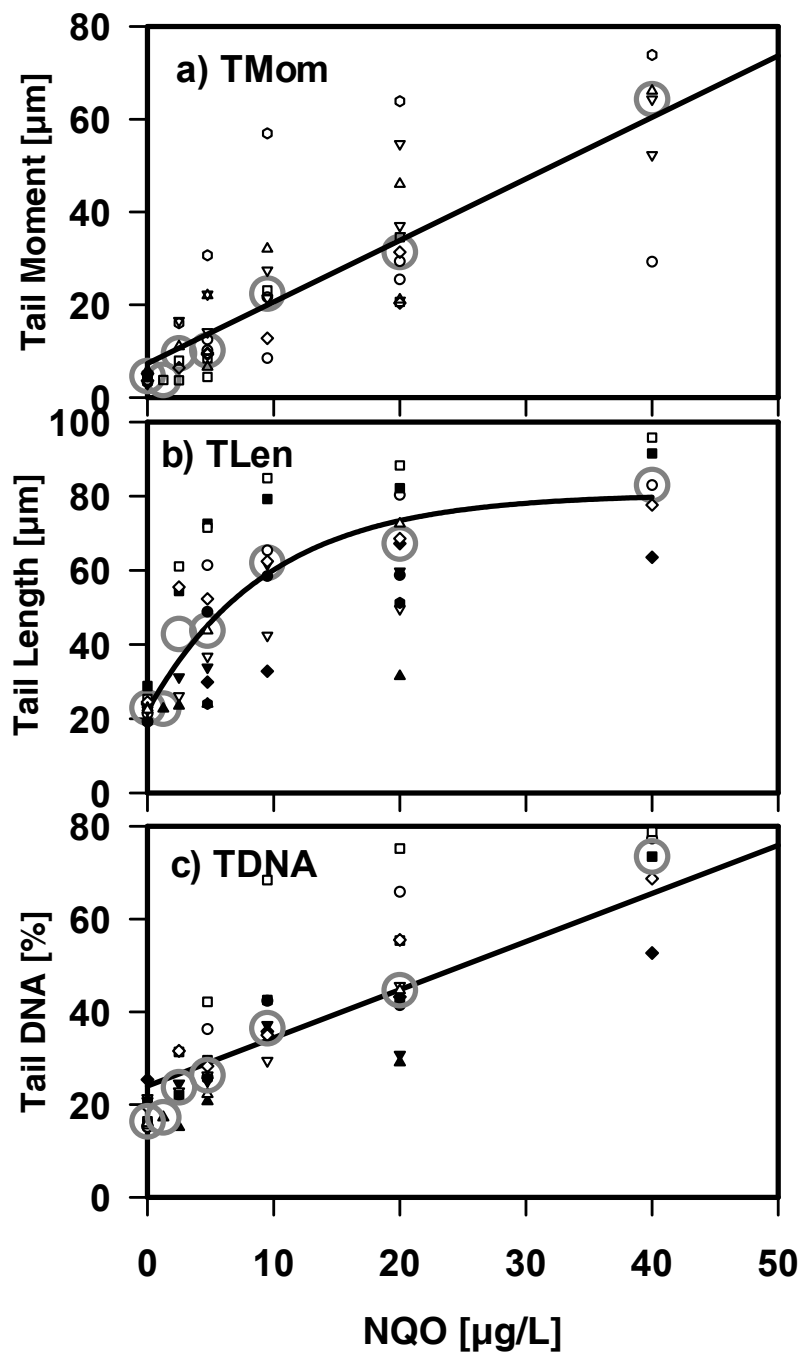


Abbildung 9: Verhalten der drei Auswertungs-Parameter Tail Moment, Tail Length und Tail DNA im Comet Assay anhand von $n = 11$ Dosis-Wirkungs-Versuchen mit NQO an RTG-2-Zellen. Es sind sowohl die Werte aus den einzelnen Versuchen dargestellt (kleine Symbole, Mediane aus je 100 Zellen) als auch die Medianwerte aus den 11 Versuchen (große Kreise). (Gleiche Versuche wie in Tab. 9.) a) Tail Moment: Hier wurde ein linearer Verlauf über den gemessenen Bereich angenommen (Regressionsgerade: $y = 1,33 x + 7,32$; $r = 0,83$). b) Tail Length: Der Verlauf war hier nicht linear, sondern ein steiler exponentieller Anstieg bis zu einem Maximum (Regressionskurve: $y = 58,4089 \cdot (1 - e^{-0,1047x}) + 22,19$; $r = 0,97$). c) Tail DNA: Hier konnte eine lineare Regression vorgenommen werden ($y = 1,038 x + 23,98$; $r = 0,83$). Im unteren Dosisbereich war jedoch auch bei a) und c) eine Abweichung von der Linearität festzustellen.

Die Frage, ob die Werte statistisch signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht waren, lieferte für die oben (in Abb. 9) behandelten 11 Versuche das in Tabelle 1 dargestellte Ergebnis. Der Parameter Tail Length besaß in einem Fall eine größere Sensitivität als der Parameter Tail Moment und in zwei Fällen eine höhere Sensitivität als der Parameter Tail DNA. Eine hohe Sensitivität des Parameters Tail Length stimmt überein mit dem oben gezeigten steilen Anstieg bei kleinen Konzentrationen (Abb. 9).

Tabelle 1: Sensitivitätsvergleich der Auswertungsparameter Tail Length (TL), Tail DNA (TDNA) und Tail Moment (TM). Es ist jeweils angegeben, welche Parameter signifikant erhöht waren. "Alle" steht für alle drei genannten Parameter (Gleiche Versuche wie in Tab. 9 und Abb. 9).

Nr.	Datum	0 µg/l NQO	1,25	2,5	4,75	9,5	20	40	80
1	25.02.97	NegK			alle	alle	alle		
2	05.03.97	NegK			alle	alle	alle	alle	
3	12.03.97	NegK		alle	alle	alle	alle		
4	16.03.97	NegK		TL	TM, TL	alle	alle		
5	22.03.97	NegK		alle	alle	alle	alle	alle	
6	09.04.97	NegK		alle	alle	alle	alle	alle	
7	30.05.98	NegK			alle	alle	alle	alle	
8	31.08.98	NegK		alle	alle	alle	alle	alle	alle
9	04.12.98	NegK	kein	kein	alle		alle		
10	16.12.98	NegK			alle		alle		
11	30.12.98	NegK			alle		alle		

Um den Anstieg der Parameter über den getesteten Bereich besser miteinander vergleichen zu können, wurden in Abb. 10 die Parameter eines Versuchs durch Division mit der jeweiligen Negativkontrolle (Median Probe / Median Negativkontrolle) auf eine gleiche, relative Einheit gebracht (diese Darstellungsweise wird aber an keiner anderen Stelle der vorliegenden Arbeit verwendet). Relativ zur Negativkontrolle besaß dann das Tail Moment gegenüber den beiden anderen relativierten Parametern immer eine größere Steigung (Abb. 10 und nicht dargestellte Versuche) (ausgenommen sind sehr niedrige Dosen). Ein Vergleich der Steigungen von relativer Tail Length und relativer Tail DNA untereinander ergab aber keine "Gesetzmäßigkeit". Das Ergebnis einer größeren Steigung beim Tail Moment galt sowohl im oberen Dosisbereich als auch bei nicht relativierten Werten (s. Abb. 9). Dies stimmte mit der theoretischen Erwartung für das Tail Moment überein, da dieses das mathematische Produkt aus den beiden anderen Parametern ist (s. 2.4). Aus der größeren Steigung des relativen Tail Moments kann nicht auf eine höhere Auflösung von Konzentrationsunterschieden geschlossen werden, denn auch die Variabilität nimmt beim Tail Moment relativ zur Kontrolle entsprechend stärker zu als bei den anderen Parametern. Auch dies erklärt sich rechnerisch.

Die auf Negativkontrollen relativierte Darstellungsweise erbrachte also keine Erkenntnisse bezüglich der Bildanalyseparameter, die man nicht auch mathematisch

hätte herleiten können. Auf die dagegen tatsächlich gezeigten Unterschiede der (nicht relativierten) Parameter und deren mögliche Vor- und Nachteile wird in der Diskussion eingegangen.

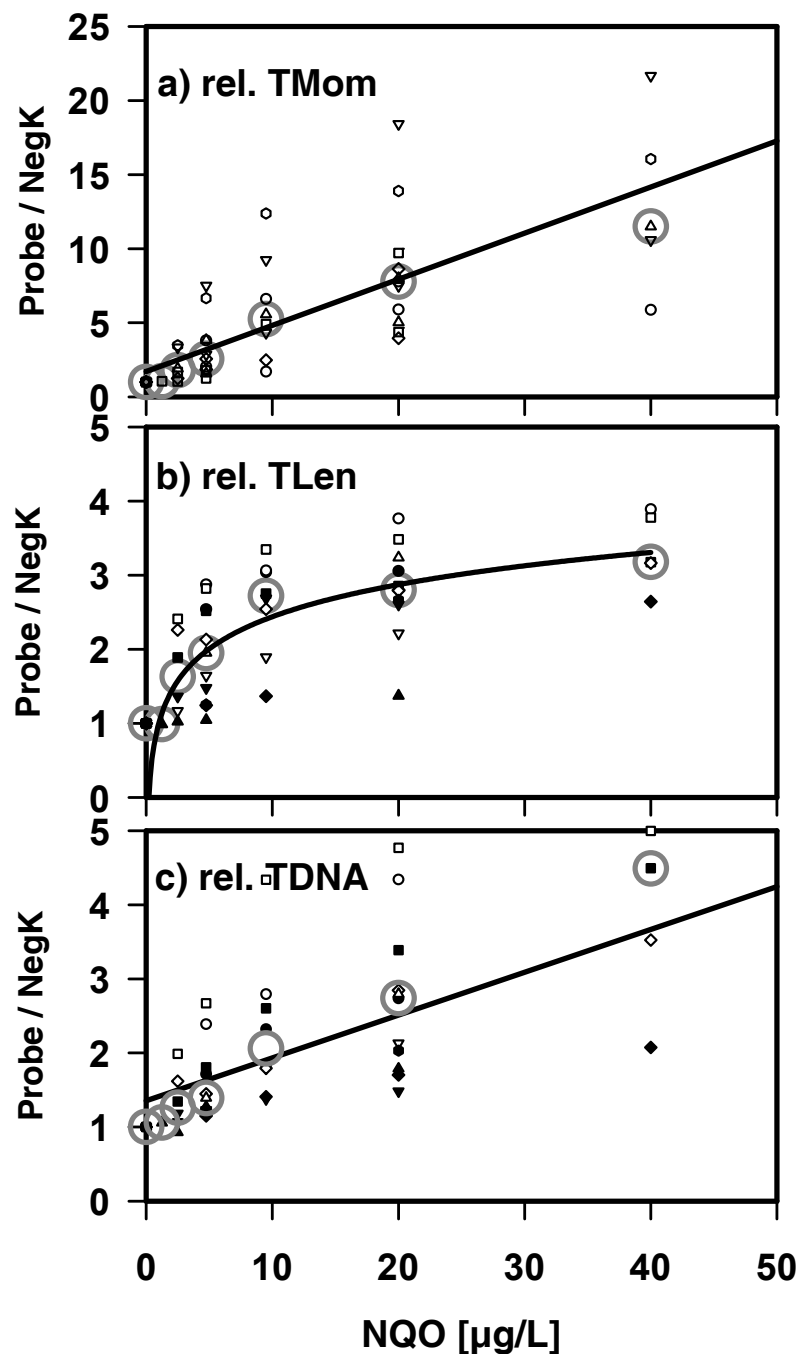


Abbildung 10: Exemplarischer Vergleich der Auswertungsparameter Tail Moment, Tail Length und Tail DNA bezogen auf die jeweiligen Negativkontrollen (daher "relative" Werte: jeder Einzelwert wurde durch den Medianwert der Negativkontrolle dividiert). Das Tail Moment stieg mit zunehmender Dosis stärker an als die Tail Length oder Tail DNA, wenn die Werte - wie hier - als Vielfache der Negativkontrolle ausgedrückt werden (dieser Unterschied zwischen dem relativen Tail Moment und den beiden anderen Parametern traf generell zu). Die größere Steigung des relativen Tail Moments ergibt keine höhere Auflösung, denn die statistische Signifikanz der Parameter stimmt überein, und auch die Variabilität ist relativ zur Kontrolle größer als bei den beiden anderen Parametern (siehe im Boxplot dargestellte 25- und 75, 10- und 90 % - Quantile). Die größere Steigung des Tail Moments ergibt sich rein aus dessen Berechnung als Produkt der beiden anderen Parameter (siehe Text).

3.2 Eigenschaften und Reproduzierbarkeit des Testsystems am Beispiel von NQO

3.2.1 Vorbemerkungen zu Eigenschaften und Reproduzierbarkeit

Zur Untersuchung der grundsätzlichen Eigenschaften (z. B. Werteverteilung), der Reproduzierbarkeit und Variabilität im Comet Assay mit Fischzelllinien wurde eine breite Datenbasis von Versuchen mit NQO und den zugehörigen Negativkontrollen herangezogen: siehe Abb. 11, 12 und Tab. 3. Die Werte stammen sowohl aus den mit Wasserproben, bei denen NQO als Positivkontrolle mitgeführt wurde, als auch aus den mit NQO gemachten Versuchen. Es handelt sich also um den Großteil der gesamten in dieser Arbeit vorgestellten Versuche mit RTG-2-Zellen. Für vollständige NQO-Dosis-Wirkungs-Kurven lagen weniger Werte vor als für NQO-Negativkontrollen, daher werden folgend zum Teil verschiedene Anzahlen n als Datenbasis herangezogen. Wenn auch für einige statistische Zwecke ausbalancierte n -Anzahlen notwendig sind, überwiegt in diesem Fall der praktische Vorteil, möglichst viele der vorhandenen Daten aus den verschiedenen anderen Fragestellungen einzubeziehen. Wie im Methodenteil beschrieben (s. 2.9), gilt allerdings natürlich auch hier die konstante Anzahl von $n = 100$ ausgewertete "Comets" (Einzelzellen) für jeden einzelnen Konzentrationsansatz.

Aus einer Gesamtheit von 84 Negativkontroll-Werten (s. Abb. 11) wurden 83 Werte als gültig betrachtet. Hier wurde als Auswahlkriterium angenommen, dass die Werte der Negativkontrolle für einen gültigen Versuch kleiner als das 99 %-Quantil der 84 Werte ($13,84 \mu\text{m}$), sein mussten. Strengere Selektionsmaßstäbe (z. B. das 95 %-Quantil) sind möglich, jedoch sollten hier mögliche Einflüsse auf das Testergebnis zunächst untersucht und nicht sofort ausgeschlossen werden.

Bevor die Daten näher betrachtet werden, soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die Variabilität auf mehreren Ebenen untersucht werden kann: Zunächst besitzt die Verteilung der in einem Einzelversuch an einer Konzentration gemessenen 100 Zellen einen Median (als Lageparameter) und verschiedene Streuungsparameter, die die Variabilität beschreiben, z. B. Quantile und Variationskoeffizient. Diese Verteilung soll hier als *Einzelversuchsverteilung (intra-experimentelle Verteilung)* bezeichnet werden. Des Weiteren bilden die Ergebnisse der Versuchswiederholungen (an verschiedenen Tagen) ihrerseits Verteilungen, die durch Lage- und Streuungsparameter beschrieben werden können. Diese *versuchsübergreifende (inter-experimentelle)* Verteilung ist nicht unabhängig von den Einzelversuchsverteilungen, jedoch spielen dabei hinzukommende Faktoren eine Rolle (z. B. die Verwendung unterschiedlicher Stammlösungen, s.u.). Zur Erklärung und Herleitung der statistischen Kenngrößen von Einzelversuchen und versuchsübergreifender Ebene sind die Ebenen in Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2: Berechnung von statistischen Kenngrößen in Einzelversuchs- und versuchsübergreifenden Ebenen. Zur Definition der Angaben in diesem Kapitel. Kenngrößen: Median (**m**), Standardabweichung (**s**) und Quantile (**q**). **TM**: Tail Moment; (*): Die Daten aus der "*versuchsübergreifenden Ebene I*" werden im Text auch als "*durchschnittliches* Tail Moment/Standardabweichung/Quantil usw. der Einzelversuche" bezeichnet. Hier wird ein Median aus Medianen oder ein Median aus Standardabweichungen mehrerer Einzelversuche gebildet. So liefern die Werte gewissermaßen einen Modellwert für einen Einzelversuch. Die Daten aus der "*versuchsübergreifenden Ebene II*" sind dagegen ausschließlich Berechnungen mit dem Median der Tail Moments der Einzelversuche, also z. B. der Median der Mediane oder die Standardabweichung der Mediane. Damit soll die versuchsübergreifende Variabilität bzw. Reproduzierbarkeit der Gentoxizitäts-Messwerte anschaulicher gemacht werden.

EBENE	BEISPIEL- DEFINITION		
Zelle (1 Messwert)	TM_{ZELLE}		
Einzelversuch (n = 100 Zellen)	$m(TM_{ZELLEN})$ = $TM_{EINZELVERSUCH}$	$s(TM_{ZELLEN})$ = $s_{EINZELVERSUCH}$	$q(TM_{ZELLEN})$ = $q_{EINZELVERSUCH}$
versuchsübergreifend, Ebene I (n = unterschiedl. Anzahlen von Einzelversuchen)	$m(TM_{EINZELVERSUCHE})$ (*)	$m(s_{EINZELVERSUCHE})$ (*)	$m(q_{EINZELVERSUCHE})$ (*)
versuchsübergreifend, Ebene II (n = unterschiedl. Anzahlen von Einzelversuchen)	$m(TM_{EINZELVERSUCHE})$ = TM_{GESAMT}	$s(TM_{EINZELVERSUCHE})$ = s_{GESAMT}	$q(TM_{EINZELVERSUCHE})$ = q_{GESAMT}

3.2.2 Basisdaten des Systems (RTG-2-Zellen/NQO)

Zunächst sollte das Testsystem RTG-2 / NQO grundlegend charakterisiert werden. Anhand dieser Charakterisierung war eine Orientierung für darauf folgende Fragestellungen möglich und es konnten geeignete statistische Bewertungsmethoden erstellt werden. Die Beschreibung der Reproduzierbarkeit des Testsystems baut auf diesen Daten auf.

Negativkontrollen: Die versuchsübergreifende Verteilung der Tail-Moment-Medianwerte von unbehandelten Zellen (Negativkontrollen) weicht von einer Normalverteilung ab (s. Histogramm: Abb. 11; Boxplot: Abb. 12); sie ist asymmetrisch nach rechts ausgezogen (Skewness = Schiefe = + 1,5; linkssteil bzw. rechtsschief). Die inter-experimentelle Verteilung mehrerer Versuche ähnelt somit der intra-experimentellen Verteilung für die Messwerte von 100 Zellen einer Negativkontroll-Einzelprobe, (s. Abb. 6 im Abschnitt 2.9). Zur Mittelung von mehreren Versuchen wurde in der vorliegenden Arbeit der Medianwert gegenüber dem arithmetischen Mittelwert bevorzugt, da der Median bei nicht-normalverteilten Daten benutzt wird und stabiler gegenüber einzelnen stärkeren Abweichungen ist.

Eine durchschnittliche Negativkontrolle besaß ein Tail Moment von ca. 4-5 μm (s. Tab. 3 u. Abb. 11). RTG-2-Zellen, die mit 20 $\mu\text{g/l}$ NQO behandelt wurden, hatten ein durchschnittliches Tail Moment von 22 μm (Median von Tail-Moment-Medianen aus Einzelversuchen), bzw. ein 5-fach erhöhtes Tail Moment gegenüber der Negativkontrolle (Tab. 4). Bei Exposition mit 40 $\mu\text{g/l}$ betrug der durchschnittliche Tail-Moment-Median 42 μm , bzw. das 9- bis 10-fache der Kontrolle (Tab. 3 und 4; Abb. 11, Abb. 12). (Der maximale Messwert eines Einzel-Tail-Moments lag bei 100-120 μm ; die Messung noch stärkerer Schädigungen war durch die Auswertbarkeit mit dem Bildanalysesystem begrenzt, weil es automatisch den Punkt der Maximalintensität als Bestandteil des Kometenkopfes annahm, selbst wenn dieser im Kometenschweif lag).

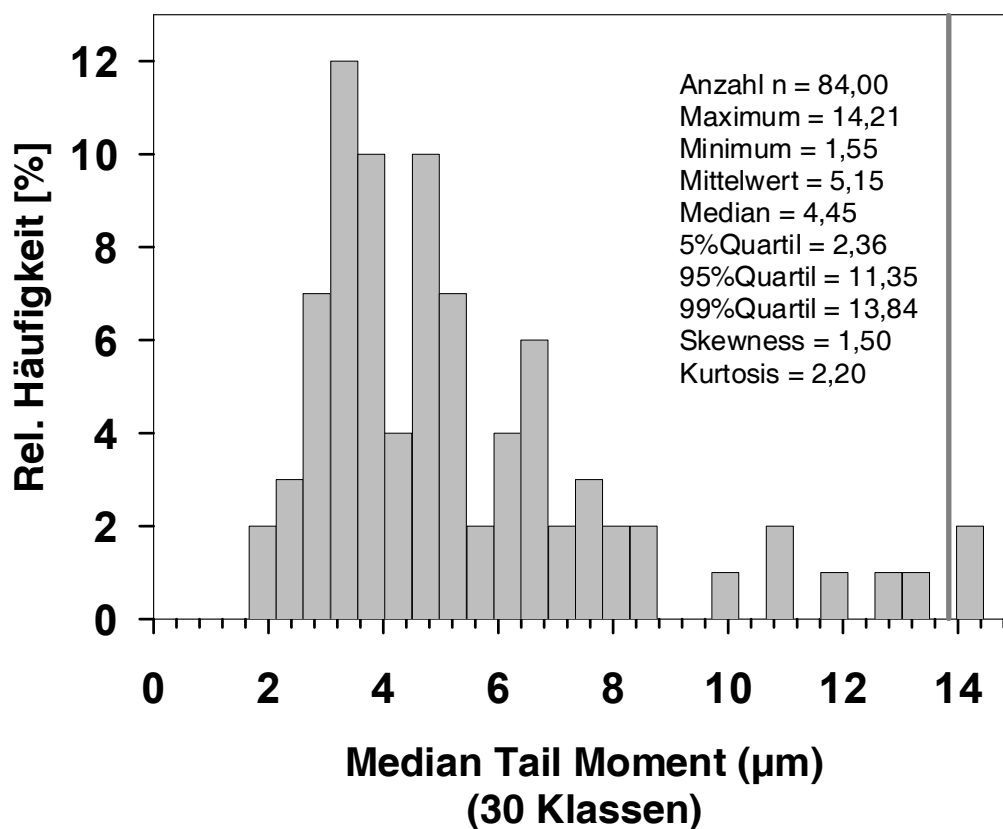


Abbildung 11: Unbehandelte RTG-2-Zellen im Comet Assay: Versuchsübergreifende Häufigkeitsverteilung des Tail Moments (Mediane aus 100 Comets) von n = 84 Negativkontrollen. Negativkontrollen mit einem Tail Moment $\geq 13,84$ (Linie eingezeichnet) wurden als ungültig betrachtet (siehe Text). Die statistischen Parameter beziehen sich in der Abbildung aber noch auf alle 84 Werte. Die rechts von der roten Linie liegenden zwei Werte werden später ausgeschlossen.

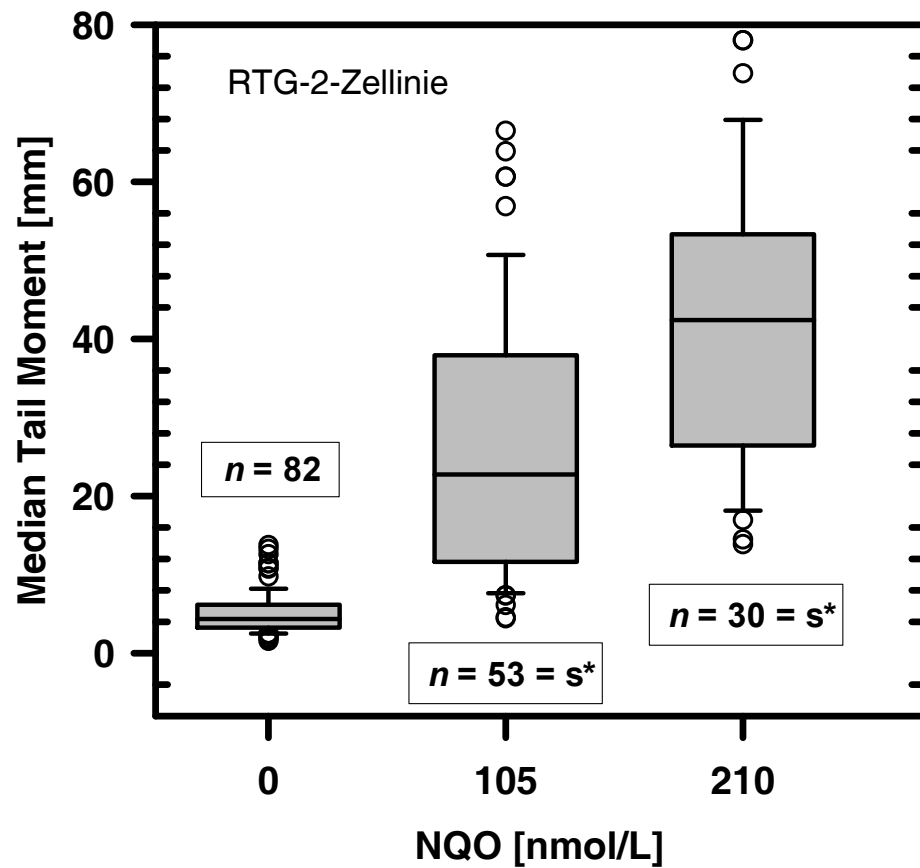


Abbildung 12: Ergebnisse des Comet Assay aus Versuchswiederholungen mit und ohne NQO an RTG-2-Zellen. Die Boxplots stellen Verteilungen aus n Einzelversuchen dar: Anzahlen n und die Konzentrationen von NQO sind jeweils angegeben, NegK = Negativkontrolle ohne NQO. s* kennzeichnet die Anzahl der Versuche, in denen die Erhöhung gegenüber der jeweiligen Negativkontrolle signifikant war. Vergleich zu RTL-W1-Zellen siehe unten, Abb. 25.

Tabelle 3: DNA-Schädigung (Tail Moment absolut in μm) bei RTG-2-Zellen bei versuchsübergreifender Auswertung insgesamt und in Abhängigkeit von verschiedenen NQO-Stammlösungen. Statistische Kenngrößen für die Exposition von RTG-2-Zellen an NQO. Berechnungen in dieser Tabelle: Schritt 1: Median des Tail Moments der NQO-behandelten Probe (100 Comets pro Einzelversuch) Schritt 2: Berechnung der angegebenen statistischen Kenngrößen für die Mediane von (Anzahl n) Einzelversuchen. Es handelt sich also um Mediane von Einzelversuchs-Medianen, Mittelwerte von Einzelversuchs-Medianen, Quantile von Einzelversuchs-Medianen usw. ("versuchsübergreifende Ebene I" wie oben beschrieben). In dieser Tabelle werden die Unterschiede der gentoxischen Reaktion zwischen den verschiedenen NQO-Stammlösungen deutlich, auf die später im Text noch eingegangen werden wird (siehe 3.2.3.5).

Anmerkungen zur Datenbasis (Anzahl n): Gesamtheit aller Versuche mit NQO (Dosis-Wirkungs-Versuche und Wasserproben-Versuche mit NQO-Positivkontrollen. Für Negativkontrollen und NQO-Versuche waren unterschiedliche Anzahlen von Versuchen vorhanden. "Alle" bezieht zusätzlich auch NQO-Stammlösungen mit ein, die hier nicht weiter dargestellt werden

Konzentration	Stammlsg.	Anzahl n	Mittelwert	Median	5 %Quantil	95 %Quantil
RTG-2/Negativkontr.	-	82	5,02	4,36	2,35	10,88
RTG-2/ 20 $\mu\text{g/l}$ NQO	Alle	53	26,48	22,76	6,85	58,39
RTG-2/ 40 $\mu\text{g/l}$ NQO	Alle	30	42,59	42,41	15,59	71,95
RTG-2/ 20 $\mu\text{g/l}$ NQO	13.01.97	12	37,47	37,22	20,49	58,81
"	17.06.97	3	24,41	18,67	12,37	40,48
"	09.09.97	25	26,07	21,80	7,41	59,89
"	09.03.98	4	10,83	9,53	5,29	18,19
"	17.04.98	5	8,80	9,98	5,01	11,31
"	31.08.98	3	37,49	37,00	34,79	40,52
RTG-2/ 40 $\mu\text{g/l}$ NQO	13.01.97	3	68,07	66,11	64,47	73,05
"	17.06.97	5	19,91	19,38	14,49	25,74
"	09.09.97	6	56,51	53,21	42,73	74,51
"	09.03.98	3	26,68	25,60	15,59	38,52
"	31.08.98	11	46,70	46,34	31,78	63,35

Tabelle 4: DNA-Schädigung relativ zu Negativkontrollen bei RTG-2-Zellen bei versuchsübergreifender Auswertung insgesamt und in Abhängigkeit von verschiedenen NQO-Stammlösungen. Statistische Kenngrößen für die Exposition von RTG-2-Zellen an NQO. Gleiche Versuche wie Tab. 3, jedoch ist hier dargestellt, wie stark der DNA-Schaden **relativ zur jeweiligen Negativkontrolle** zunahm. Diese relationale Darstellung soll einen anschaulichen Eindruck vom Anstieg des Effektes mit der Dosis geben. Zum Beispiel deutet sich eine unterschiedliche Wirksamkeit der verschiedenen Stammlösungen (siehe 3.2.3.5) anschaulicher an, als in Tab. 3 - ohne dass hierdurch der Informationsgehalt höher wäre, wie bei einer Regression oder einem Signifikanztest. Durch den Bezug zum jeweiligen Einzelversuch ergibt sich aber auch ein etwas anderes Bild als in Tab. 3. Der Anstieg der Mediane ist hier etwas abgemildert, ebenso das untere Quantil, während das obere Quantil stärker ansteigt. Die Division durch die jeweilige Negativkontrolle hat einen gewissen "Normierungs- bzw. Nivellierungseffekt". Berechnung in dieser Tabelle: Schritt 1: Median des Tail Moments der NQO-behandelten Probe dividiert durch Median des Tail Moments der Negativkontrolle desselben Einzelversuchs; Schritt 2: Weitere Berechnung der gezeigten statistischen Kenngrößen aus diesen (Anzahl n) Relativwerten der Einzelversuche.

Konzentration	Stammlsg.	Anzahl n	Mittelwert	Median	5 %Quantil	95 %Quantil
RTG-2/Negativkontr.	-	82	1,00	1,00	1,00	1,00
RTG-2/ 20 µg/l NQO	Alle	53	6,59	4,58	1,01	15,60
RTG-2/ 40 µg/l NQO	Alle	30	10,05	7,64	2,38	22,34
RTG-2/ 20 µg/l NQO	13.01.97	12	7,64	6,11	2,92	15,93
"	17.06.97	3	5,16	5,96	3,69	6,07
"	09.09.97	25	7,41	4,69	1,86	18,88
"	09.03.98	4	2,16	2,04	0,75	3,74
"	17.04.98	5	2,76	1,81	1,48	5,27
"	31.08.98	3	10,41	9,71	7,71	13,61
RTG-2/ 40 µg/l NQO	13.01.97	3	16,40	16,05	11,95	21,10
"	17.06.97	5	6,12	4,71	4,04	9,00
"	09.09.97	6	6,90	6,90	4,98	9,01
"	09.03.98	3	5,57	7,19	2,29	7,71
"	31.08.98	11	10,57	9,99	5,68	17,20

3.2.3 Variabilität/Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

3.2.3.1 Ziele der Reproduzierbarkeitsuntersuchung

In der Literatur findet man folgende Definition für "Wiederholungsgenauigkeit" bzw. "Reproduzierbarkeit" bzw. für den englischen Begriff "Precision": "Precision is the effectiveness of a measurement process in producing similar results on repeated application" (Newman 1995). Die statistische Präzision ist unter anderem abhängig vom Stichprobenumfang. Ein davon abgetrennter Begriff ist die "Richtigkeit" bzw. "Treffsicherheit", englisch: "Accuracy", die aussagt, wie nah die gemessenen Werte am wahren Wert liegen. Obwohl "Precision" und "Accuracy" nicht gesetzmäßig voneinander abhängig sind, führt eine schlechte Präzision in der Mess- oder Versuchspraxis häufig zu einer schlechten Treffsicherheit. Eine gute Präzision führt zu einer guten Treffsicherheit - wenn keine systematischen bzw. Messfehler vorliegen. Die Beschreibung der Variabilität bzw. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist im vorliegenden Fall also wichtig, um die

Wiederholbarkeit, Aussagesicherheit und Eignung des Testsystems als Routinetest zu beschreiben, um Optimierungsversuche quantitativ überprüfen zu können und um quantitative Vergleiche zu anderen Testsystemen oder Labors ziehen zu können. In der Variabilität können sich auch substanz- und konzentrationspezifische Informationen ausdrücken. Das Ziel für ein Testsystem ist, eine möglichst hohe inter-experimentelle Reproduzierbarkeit (Präzision) zu erreichen.

Im Folgenden sollen

- die quantitative Beschreibung des Testsystems RTG-2 vertieft werden;
- Daten zum Vergleich mit den später beschriebenen RTL-W1-Zellen geliefert werden
- unterschiedliche statistische Reproduzierbarkeits-Parameter vorgeschlagen und exemplarisch für RTG-2-Zellen angegeben werden;
- die nachträgliche Identifikation von Varianzquellen anhand des Beispiels "NQO-Stammlösungen" gezeigt werden.

Zur Beschreibung der Reproduzierbarkeit der Versuche sollen hier zunächst wiederum die Verteilungen bei den verschiedenen Konzentrationen und deren Variabilität betrachtet werden, allerdings unter dem Gesichtspunkt, wie gut sie qualitativ und quantitativ von Versuch zu Versuch übereinstimmen. Hier interessieren also die inter-experimentellen Varianzen, die zum Teil - wie bereits oben gesagt - von intra-experimentellen Varianzen abhängen. Wiederum können statistische Lage- und Streuungsmaße angegeben werden. Dies sind die Standardabweichung zum arithmetischen Mittelwert bei normalverteilten Werten und der Median und bestimmte Quantile bei nicht-normalverteilten Werten. Zum anderen kann die Reproduzierbarkeit auch unter der Fragestellung betrachtet werden, wie gut verschiedene Konzentrationen in Versuchswiederholungen voneinander unterscheidbar sind. Oberflächlich gibt die Betrachtung der Verteilungen bzw. Streuungsmaße hierzu einen Eindruck. Darüber hinaus kann dieser Eindruck durch die Anwendung statistischer Konzepte quantifiziert werden, d. h. es können Wahrscheinlichkeiten zu bestimmten Aussagen angegeben werden, z. B. dazu, wie gut sich die gentoxische Reaktion der RTG-2-Zellen auf 20 µg/l NQO von der Reaktion auf 40 µg/l NQO in Wiederholungsversuchen unterscheiden lässt.

3.2.3.2 Reproduzierbarkeit anhand von Streuungsmaßen

Als relevante Streuungsmaße sind in den Tabellen 3 und 4 die versuchsübergreifenden 5 %- und 95 %-Quantile im Vergleich zu den Medianen für das Tail Moment abzulesen. Weiterhin sind in Tabelle 5 nochmals der Median sowie die Abweichungen von den 15,87 %- und 84,14 %-Quantilen auf den Ebenen von Einzelversuchen sowie versuchsübergreifend angegeben. Diese Quantilsabweichungen werden hier vergleichend angegeben, weil sie in Bezug auf den verteilungsumspannenden Bereich analog zur Standardabweichung sind und somit ein gewohntes, anschaulich-vergleichendes Maß für den statistisch weniger Geübten darstellen. Diese Quantile können also den gewohnten Standardabweichungen besser gegenübergestellt werden, als die 5 % und 95 %-Quantile (s. Tab. 5). Eine exakte Vergleichbarkeit ist aber wegen der Asymmetrie der Verteilungen nicht gegeben.

Tabelle 5: Inter-experimentelle Variabilität bei Versuchen mit RTG-2-Zellen als Maß für die Reproduzierbarkeit und als Voraussetzung zur Berechnung von statistischer Teststärke (engl. "Power") bzw. Anzahl benötigter Versuchswiederholungen. **n**: Anzahl von Einzelversuchen; **TM**: Median eines Einzelversuchs aus den Tail-Moments von 100 Zellen; **m()**: Median des Wertes in Klammern aus n Einzelversuchen (Versuche wie in Tabelle 3).

s(): Standardabweichung des Wertes in Klammern; **D₁** bzw. **D₂**: Distanz (Betrag der Differenz) von m(TM) zum Median der **15,87 %**- bzw. **84,14 %-Quantile** der Einzelversuche. Diese Quantile wurden in Analogie und zum besseren Vergleich mit der Standardabweichung **s** errechnet, da sie ebenso wie **s** einen Bereich von 68,27 % der Verteilung umspannen, aber hier keine Normalverteilung vorlag. Quantile setzen im Gegensatz zur Standardabweichung keine Normalverteilung voraus. Eine exakte Vergleichbarkeit ist aber wegen der Asymmetrie der Verteilungen nicht gegeben. Die weiter unten durchgeführte Berechnung der statistischen Teststärke benötigt dann eine Standardabweichung, wobei auf die "echten" Standardabweichungen zurückgegriffen werden wird. Zur Definition der "Ebenen" s. Tab. 2.

	NegK	20 µg/l NQO	40 µg/l NQO
Anzahl n	82	53	30
\bar{t}_m	(n x 100 Einzelwerte)	(n x 100 Einzelwerte)	(n x 100 Einzelwerte)
$m(\bar{t}_m) = TM$	(n versch. Werte)	(n versch. Werte)	(n versch. Werte)
$m(TM) = M$	4,36	22,76	42,41
$q_{15,87}(TM) = Q_1$	2,91	10,05	24,05
$q_{84,14}(TM) = Q_2$	7,11	43,27	59,94
$D_1 = Q_1 - M$	(-) 1,45	(-) 12,71	(-) 18,36
$D_2 = Q_2 - M$	(+) 2,75	(+) 20,51	(+) 17,53
$(-D_1 + D_2)/2$ = Vergleichswert für $s(TM)$	(±) 2,10	(±) 16,61	(±) 17,94
$s(TM)$	(±) 2,63	(±) 16,71	(±) 17,99

Tabelle 6: Versuchsübergreifende Variabilität (der Mediane von 100 Tail Moments je Versuch) relativ zum Mittelwert bzw. zum Median. Zwei NQO-Konzentrationen und Negativkontrollen von RTG-2-Zellen, Versuche wie Tab. 3 und 5. Absolute Werte von **s** (Standardabweichung) und Vergleichswert für **s** siehe Tabelle 5. Berechnung: QK = (Quantilsabstand der 15,87 %- bzw. 84,14 %-Quantile / (2*Median)); Variationskoeffizient = (Standardabweichung / Mittelwert). Anmerkung: Der Variationskoeffizient ist (nur) für Normalverteilungen geeignet. QK soll demonstrieren, wie weit sich auf den Median bezogene Werte von auf den Mittelwert bezogenen Variationskoeffizienten unterscheiden. Normalverteilungstest nach Kolmogorov-Smirnov (Software SigmaStat, Version 2.0, Fa. Jandel Scientific).

Konzentration	n	Normalverteilungs-Test	QK	Variationskoeffizient
RTG-2/Negativkontr.	82	nicht erfüllt	48 %	52,47 %
RTG-2/ 20 µg/l NQO	53	erfüllt	73 %	63,10 %
RTG-2/ 40 µg/l NQO	30	erfüllt	42 %	42,23 %

Tab. 5 zeigt, dass die aus den entsprechenden Quantilen errechneten "Vergleichswerte" und die Standardabweichung selbst sich nur geringfügig unterscheiden. Etwas stärker unterscheiden sich daraus abgeleitete Werte, die zudem noch unterschiedlich dividiert

wurden, wie die Variationskoeffizienten und der hier vorgeschlagene Koeffizient "QK" (s. Tab. 6). Der Trend bleibt jedoch derselbe.

Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit soll mit der Beschreibung der Verteilungen begonnen werden: Ohne Schadstoff oder mit geringen NQO-Konzentrationen weichen die Verteilungen der DNA-Schädigung bei RTG-2 von Normalverteilungen ab und sind in Richtung höherer DNA-Schädigung ausgezogen (linkssteil, s. Abb. 11 u. 12). Mit zunehmender NQO-Konzentration verbreitern sich die Verteilungen und konvergieren gegen Normalverteilungen (genauer gesagt: sie passieren Normalverteilungstests, Tab. 6). Absolut gesehen nimmt die Variabilität mit steigender Konzentration zu (Tab. 3, 4, 5). Bezogen auf den jeweiligen Mittelwert bzw. Median (Variationskoeffizient bzw. "QK") zeigte sich jedoch versuchsübergreifend bei mittlerer Konzentration (20 µg/l) die höchste Variabilität, die dann bei höherer Konzentration (40 µg/l) wieder abnahm (Tab. 6). Nimmt man einen dieser Koeffizienten als Maß für Reproduzierbarkeit, so war die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit demzufolge im mittleren Konzentrationsbereich am geringsten.

Vergleicht man die intra- und inter-experimentelle Verteilung und Variabilität, so zeigt sich Ähnlichkeit, aber nicht Übereinstimmung (Tab. 7): Die Verteilung der Tail Moments in der Einzelversuchsebene hat eine ähnliche Form wie die in der versuchsübergreifenden Ebene (s. Abb. 6, Abschn. 2.9). Die Konzentrationsabhängigkeit ist jedoch nur ähnlich, wenn die absolute Variabilität betrachtet wird: diese nahm mit der NQO-Konzentration zu. Relativ zum Medianwert zeigte sich aber ein Unterschied: Im Einzelversuch war diese relative Variabilität von Tail Moment-Werten bei den Kontrollen am größten und nahm mit steigender Konzentration ab. Zu erklären ist dieser Unterschied zur inter-experimentellen Verteilung wohl damit, dass auch innerhalb einer an sich "gesunden" Zellpopulation einzelne Zellen über die gesamte Bandbreite - also stark - reagieren können und dies beim Messparameter "Tail Length" auch schon bei relativ geringen DNA-Schädigungen (siehe Diskussion zu den Messparametern, 4.1.3.3). Dagegen bestehen zwischen den Medianwerten unbehandelter Zellen (Negativkontrollen) von Versuch zu Versuch viel geringere Unterschiede als zwischen Zellen, ein zufälliges "Ausreißen" nach oben ist hier sehr viel unwahrscheinlicher, da jeder Medianwert jeweils auf 100 Zellen beruht.

Tabelle 7: Vergleich zwischen inter- und intra-experimenteller (Zelle-zu-Zelle-) relativer Variabilität (Koeffizient "QK", siehe Text). (Dargestellt anhand der Daten aus den 11 Versuchen mit RTG-2-Zellen/NQO aus Tab. 9 bzw. selbe Versuche wie für den Parametervergleich in 3.1.3) Auffällig sind ein quantitativer und qualitativer Unterschied bei der Variabilität der Negativkontrollen: Sie variieren weniger von Versuch zu Versuch, während bei den Zellen einer einzelnen Negativkontrolle stärkere relative Abweichungen der Tail Moments vorkommen.

Konz. NQO	n	QK inter-exp.	QK intra-exp.
0	11	20 %	120 %
4,75	11	79 %	98 %
20	11	44 %	59 %
40	5	23 %	38 %

3.2.3.3 Reproduzierbarkeit anhand der statistischen Teststärke

Ein denkbares Ziel einer praktischen Testanwendung wäre, zwischen unabhängigen Versuchen (über einen längeren Zeitraum, mit verschiedenen, unabhängigen

Testlösungen) anhand der DNA-Schädigung zwischen den Effekten unterschiedlicher Konzentrationen zu unterscheiden. Dies wird um so schwieriger, je höher die Variabilität, oder anders ausgedrückt, der Überlappungsbereich der Verteilungen bei den verschiedenen Konzentrationen ist. Dieser Überlappungsbereich war beispielsweise bei den inter-experimentellen Verteilungen für 20 und 40 $\mu\text{g/l}$ NQO wie folgt: Der Median von 20 $\mu\text{g/l}$ NQO (= 22,76) entsprach ungefähr dem 16 %-Quantil bei 40 $\mu\text{g/l}$ NQO (= 22,18) und der Median von 40 $\mu\text{g/l}$ NQO (= 42,41) entsprach ungefähr dem 81 %-Quantil bei 20 $\mu\text{g/l}$ NQO (= 41,46).

Die inter-experimentelle Unterscheidbarkeit zwischen 20 und 40 $\mu\text{g/l}$ NQO kann weiter mit Hilfe des Konzepts der statistischen "Teststärke" oder "Trennschärfe" (engl. "Power") quantifiziert werden (Die Teststärke ist im Konzept von Hypothese und Nullhypothese die Wahrscheinlichkeit für eine richtig-positive Hypothese, also dafür, dass ein wirklicher Unterschied auch als solcher erkannt wird. Zu diesen Konzepten siehe Lehrbücher der Statistik, z. B. Sokal & Rohlf 1995; Sachs 1984.) Für dieses Konzept ist eine Kenntnis oder Abschätzung der Variabilität der Daten notwendig, die in üblichen Tests (z. B. "t-Test Power" der Software SigmaStat 2.0., Jandel Scientific) in Form einer Standardabweichung einbezogen wird. Auf Grundlage der Tabellen 5 und 6 wurde für eine exemplarische und vereinfachende Berechnung die "schlechtmöglichste" Standardabweichung der Tail Moment-Mediane von 17,99 μm angenommen. Folgende weitere Daten dienten zur Berechnung:

Unterschied TM zwischen Proben:	20 μm
Standardabweichung:	17,99 μm
Anzahl Proben bei 20 $\mu\text{g/l}$:	n=53
Anzahl Proben bei 40 $\mu\text{g/l}$:	n=30
Irrtumswahrscheinlichkeit α	
(Wahrscheinlichkeit für falsch positive):	5 %.

Bei der vorliegenden hohen Anzahl von Versuchen ergibt sich so eine hohe Teststärke von 99,8 %. Umgekehrt wurde der theoretisch notwendige Stichprobenumfang bei einer bestimmten Teststärke errechnet: Danach ergab sich für eine Teststärke von 80 % (konventioneller Wert) eine Anzahl von 14 benötigten Versuchen, um zwischen den Effekten von 20 und 40 $\mu\text{g/l}$ NQO zu unterscheiden.

Dies ist eine relativ hohe Anzahl, bzw. würden geringe Anzahlen von Versuchswiederholungen eine sehr geringe Teststärke (z. B. bei 3 Versuchen 18,5 %) ergeben. Die wirkliche Reproduzierbarkeit des Tests wird jedoch so aus verschiedenen Gründen unterschätzt. Zunächst besteht eine Abhängigkeit von der statistischen Methodik. Durch die ausreichend begründete Annahme, dass der eine angenommene Mittelwert (bei 40 $\mu\text{g/l}$) immer größer als der andere (bei 20 $\mu\text{g/l}$) ist (s. unten), lässt sich ein einseitiger Test durchführen, sodass die Anzahl auf 12 sinkt. Bei Einsatz der Statistik-Software CADEMO lassen sich außerdem die ungleichen Varianzen der beiden Mittelwerte berücksichtigen. Dies führt zu $n_1 = 11$ (für 20 $\mu\text{g/l}$) und $n_2 = 10$ (für 40 $\mu\text{g/l}$). Arbeitet man mit logarithmisch transformierten Werten der Mediane oder mit den geometrischen Mitteln (welche ebenfalls eine log-Transformation beinhalten), ergeben sich allerdings wieder etwas schlechtere Werte. Für das gewählte Beispiel muss solch eine Transformation aber nicht unbedingt durchgeführt werden, da 20 und 40 $\mu\text{g/l}$ NQO als normalverteilt angenommen werden können (s. Tab. 6).

Eine weitere Unterschätzung der Reproduzierbarkeit kommt zustande, weil Varianzquellen identifiziert und eliminiert werden können. Eine solche Varianzquelle sind beispielsweise unterschiedliche Stammlösungen der gentoxischen Substanz (s. 3.2.3.5). Werden nun der Berechnung Varianzen zugrundegelegt, die innerhalb gleicher Stammlösungen auftraten, ergeben sich Anzahlen von nur noch 5 bis hinab zu 3 benötigten Versuchswiederholungen (in Tab. 3 gezeigte Versuche, ausgenommen Stammlösung v. 17.06.97).

Wurde die Frage der Unterscheidbarkeit des Effekts von 20 und 40 µg/l NQO intra-experimentell (im Einzeltest) gestellt, zeigte sich zudem ein viel stabileres Ergebnis: Beim statistischen Vergleich der Reaktion der Zellen innerhalb eines Tests war der Wirkunterschied von 20 zu 40 µg/l NQO in 6 von 7 Versuchen hochsignifikant (s. Tabelle 8). Damit kann jeder einzelne Test eine Aussage über relative Konzentrationsunterschiede liefern. Der qualitative Wert des Tests wird damit gestärkt, obwohl dies nicht die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit im obigen Sinne verbessert.

Tabelle 8: Statistische Unterscheidbarkeit der Effekte von 20 und 40 µg/l NQO in 7 Einzelversuchen (Mann-Whitney Rangsummentest, Software SigmaStat 2.0., Jandel Scientific). Median TM: Medianes Tail Moment von n = 100 Zellen. n.s.: nicht signifikant.

Versuchsdatum	20 µg/l Median TM	40 µg/l Median TM	p
05.03.97	54,66	64,29	<0,001 (*)
22.03.97	46,01	66,11	<0,001 (*)
09.04.97	63,88	43,82	0,010 (*)
19.03.98	9,60	14,48	<0,001 (*)
19.03.98	11,67	18,47	<0,001 (*)
30.05.98	29,32	29,24	0,526 (n.s.)
31.08.98	37,00	52,30	<0,001 (*)

3.2.3.4 Reproduzierbarkeit anhand von LOEC-Werten

Nachdem oben die Reproduzierbarkeit bei bestimmten Konzentrationen (als Streuungsmaße bzw. Anzahl nötiger Versuche zur sicheren Unterscheidung zweier Konzentrationen) betrachtet wurde, und auch Aussagen über die Reproduzierbarkeit der Dosis-Wirkungs-Kurven an sich gemacht wurden, kann auch die Reproduzierbarkeit der Nachweisgrenze betrachtet werden.

Als Nachweisgrenze wird die niedrigste Konzentration der Testsubstanz bezeichnet, die im Test eine statistisch signifikant von der Negativkontrolle abweichende Wirkung erzeugte. Synonym wird hier die Abkürzung LOEC (engl.: Lowest Observed Effect Concentration) verwendet. Die Sensitivität von Tests verhält sich reziprok zur Nachweisgrenze.

Die Nachweisgrenze von NQO schwankte bei RTG-2-Zellen zwischen 2,5 - 4,75 µg/l (siehe Tab. 9). Da es sich um einen engen, relativ niedrigen Konzentrationsbereich handelt, kann die Reproduzierbarkeit bei dieser qualitativen Betrachtungsweise als sehr hoch angesehen werden. Etwas anders betrachtet kann man auch von einer 100 %igen

Reproduzierbarkeit eines positiven Testergebnisses bei 4,75 µg/l NQO sprechen. Wie bei den Konzentrationsunterschieden zwischen 20 und 40 µg/l lässt sich jedoch der Effekt nicht ebenso gut quantitativ reproduzieren.

Tabelle 9: Dosis-Wirkungsverläufe von 11 Versuchen für NQO an RTG-2-Zellen. (Es handelt sich um alle hier durchgeführten, auswertbaren Dosis-Wirkungs-Versuche mit RTG-2/NQO. Selbe Versuche wie für den Parametervergleich in 3.1.3)

Versuchs-Datum	LOEC (µg/l NQO)	NOEC (µg/l NQO)	Tail Moment (µm) bei NQO-Applikation (Fettdruck: statist. sign. versch. zur NegK.)							
			µg/l NQO							
			0	1,25	2,5	4,75	9,5	20	40	80
25.02.97	4,75	0	3,27	-	-	12,47	21,62	25,46	-	-
05.03.97	4,75	0	2,97	-	-	22,26	27,41	54,66	64,29	-
12.03.97	2,50	0	4,70	-	7,93	8,44	23,10	20,59	-	-
16.03.97	4,75	2,5	5,14	-	6,40	9,55	12,76	20,36	-	-
22.03.97	2,50	0	5,75	-	11,01	22,03	32,07	46,01	66,11	-
09.04.97	2,50	0	4,60	-	16,00	30,65	56,93	63,88	73,82	-
30.05.98	4,75	0	4,98	-	-	10,14	8,46	29,32	29,24	-
31.08.98	2,50	0	4,94	-	16,53	14,12	21,41	37,00	52,30	65,46
04.12.98	4,75	2,5	3,56	3,76	3,70	4,42	-	34,54	-	-
16.12.98	4,75	0	3,63	-	-	9,30	-	31,33	-	-
30.12.98	4,75	0	4,18	-	-	6,58	-	21,10	-	-

3.2.3.5 Bedeutung von Stammlösungen als Varianzquelle für das Testergebnis

Als eine der möglichen Ursachen für die Variabilität wurden unterschiedliche Stammlösungen in Betracht gezogen. Zunächst fiel auf, dass bei einigen Versuchen nur sehr geringe Unterschiede des gentoxischen Effekts zwischen 20 und 40 µg/l NQO auftraten: Tab. 4, Stammlsg. vom 17.6.97. Dort lagen aber nur kleine Anzahlen n vor - 3 gegenüber 5, sodass als Ursache außer z. B. einem Verdünnungsfehler auch noch "normale" Varianz in Frage kommen könnte, zumal die beiden Konzentrationsstufen dieser Stammlösung in *keinem* Fall in ein und demselben Versuchsdurchlauf (=Versuchstag) getestet wurden. Außerdem gab es z.T. große Unterschiede zwischen den einzelnen Stammlösungen bei gleicher Konzentration (s. Tab. 4). Der Verdacht lag nahe, dass dies auch zu der höheren inter-experimentellen Variabilität der Effekte der behandelten Zellen gegenüber Negativkontrollen beitrug. Hier ergaben sich Beweise für Unterschiede zwischen den Stammlösungen, besonders bei der Untersuchung von 40 µg/l NQO:

Bei den 20 µg/l NQO-Versuchen ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen der wirksamsten Stammlösung vom 13.01.97 und den am wenigsten wirksamen Stammlösungen vom 17.04.98 und 09.03.98 nachweisen ("One Way ANOVA" und "All

Pairwise Multiple Comparison" nach Tukey). Bei Anwendung eines anderen Signifikanztests konnten auch die beiden stärker wirksamen Stammlösungen vom 13.01.97 und 09.09.98 voneinander unterschieden werden ("All Pairwise Multiple Comparison" nach Student-Newman-Keuls). Bei den Stammlösungen, die in der höheren 40 µg/l-Konzentration getestet wurden, ergaben sich in mehreren Fällen signifikante Unterschiede zwischen bestimmten Stammlösungen ("One Way ANOVA" und "All Pairwise Multiple Comparison" nach Tukey). Hervorzuheben sind dabei zwei weniger wirksame Stammlösungen vom 17.06.97 und 09.03.98 gegenüber zwei stärker wirksamen Stammlösungen vom 13.01.97 und 09.09.97 (s. Tab. 3). Dieses Muster war, wie oben gesagt, auch bei den 20 µg/l-Versuchen tendenziell erkennbar. Die Realkonzentrationen der Stammlösungen könnten demzufolge unterschiedlich gewesen sein.

Werden Expositionen betrachtet, die mit denselben Expositionslösungen (an ein- und demselben Versuchstag) durchgeführt wurden, liegen die Effekte von niedrigen NQO-Konzentrationen erwartungsgemäß meist niedriger als Effekte von hohen Konzentrationen. Dieses Ergebnis wird auch durch Tabelle 8 dokumentiert. Ausnahmen davon gab es im sehr niedrigen Konzentrationsbereich (s. Dosis-Wirkungs-Verläufe in Abb. 9 u. Tab. 9), aber die dortigen Unterschiede waren nicht signifikant. Bei 20 µg/l gegenüber 40 µg/l NQO gab es solche "Umkehrungen" bei den als gültig eingestuften Versuchen nicht (n = 7 Versuche, in denen gleichzeitig 20 und 40 µg/l NQO getestet wurden).

Die quantitative Unterscheidung gentoxischer Effektstärken ist folglich am sichersten, wenn Expositionen betrachtet werden, die mit denselben Expositionslösungen (an ein- und demselben Versuchstag) durchgeführt werden. Bei der Wiederholung von Versuchen kommen Unwägbarkeiten hinzu, die sich in Form verstärkter Variabilität bzw. verschlechterter Reproduzierbarkeit ausdrücken. Als eine wichtige dieser "Unwägbarkeiten" konnte hier identifiziert werden, dass Unterschiede zwischen den Stammlösungen bestanden. Sehr wahrscheinlich (aber nicht direkt nachgewiesen) handelte es sich um Abweichungen der Konzentrationen vom beabsichtigten Wert. Natürlich besteht hier das Optimierungsziel, die inter-experimentelle Varianz dadurch zu verringern, genau übereinstimmende NQO-Stammlösungen herzustellen. Da sich dies aber als methodisch schwierig erweisen kann (Abwiegen und Verdünnen "von Hand") und vielleicht keine ausreichende Sicherheit erlangt werden kann, würde eine chemisch-analytische Überprüfung der Realkonzentrationen der Expositionslösungen sicher einen Gewinn an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit erbringen. Zu weiteren Varianzquellen wird mehr in der Diskussion gesagt werden.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse des gesamten vorliegenden Kapitels werden unter 4.1.5 zusammengefasst und diskutiert.

3.3 DNA-Schädigungskinetiken und DNA-Reparatur-Inhibition

3.3.1 Fragestellungen

Zunächst musste für die RTG-2-Zellen eine geeignete Expositionsdauer gefunden werden. Neben der grundsätzlich "vorsichtigeren" Annahme, zunächst davon auszugehen, dass sich Säuger- und Fischzellen unterscheiden, sprachen auch bekannte Argumente dafür, dass die für Säugerzellen publizierten Expositionszeiten nicht einfach a priori übernommen werden konnten. Fischzellen werden bei niedrigeren Temperaturen als Säugerzellen kultiviert und unterscheiden sich u.a. in ihrem Metabolismus. Eine optimale Expositionszeit sollte folgende Kriterien erfüllen: einerseits sollte eine möglichst hohe DNA-Schädigung hervorgerufen werden, andererseits jedoch sollte die Dauer für einen Kurzzeit-Gentoxizitätstest noch praktikabel sein.

Aus den im Folgenden beschriebenen Experimenten zum DNA-Schadensverlauf ergaben sich weitere Fragen zu den Ursachen der Entstehung dieser DNA-Strangbrüche in den Zellen und zum Funktionsprinzip des Comet Assay, die sowohl hinsichtlich der Methodik als auch für die biologische Relevanz dieses Tests von Bedeutung sind. Daher muss die Vorbemerkung gemacht werden, dass die Untersuchung nicht auf das reine Finden der besten Expositionszeit beschränkt, sondern mit einigen vertiefenden Untersuchungen verbunden wurde.

Folgende Fragen wurden bearbeitet:

- Welches ist die (im oben beschriebenen Sinne) optimale Expositionszeit für RTG-2-Zellen?
- Wie verlaufen die DNA-Schäden in RTG-2-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit (Kinetik)?
- Welche Beiträge leisten Schadstoffmetabolisierung und DNA-Reparaturmechanismen in den Zellen zur Entstehung der DNA-Strangbrüche? (Über die Metabolisierung wurden hier nur indirekte Hinweise ermittelt.)
- Wie beständig sind die DNA-Schäden in RTG-2-Zellen? Welche Rückschlüsse und Interpretationen lassen sich daraus für die DNA-Reparaturkapazität dieser Zellen ziehen?

Anmerkung: Die Untersuchungen des Themengebiets der DNA-Reparatur gehen zwar über eine grundlegende Charakterisierung des Zell-Testsystems - wie die Feststellung der optimalen Expositionszeit - hinaus, werden aber ebenfalls in dem vorliegenden Kapitel behandelt, weil so die Aspekte der zeitabhängigen Prozesse besser miteinander verglichen werden können und die Experimente mit Reparaturinhibitoren und Medien austausch auch in engem zeitlichen Zusammenhang durchgeführt wurden, denn die Zeitreihen der unbehandelten Proben dienten zum Teil als Referenz für diese Versuche.

3.3.2 Kinetiken der DNA-Schädigung in RTG-2-Zellen und optimale Expositionszeit

Schädigungskinetik:

Der zeitliche Verlauf (Kinetik) der DNA-Schädigung von RTG-2-Zellen durch NQO wurde anhand von unterschiedlich langen Expositionszeiten mit 40 µg/l NQO untersucht. Es zeigte sich ein rascher Anstieg von Strangbrüchen innerhalb einer Stunde, dann wurde das Maximum nach etwa 2 h erreicht. Danach begann die Reaktion abzuklingen und ging nach 4 - 8 h auf etwa die Hälfte zurück, um schließlich nach ca. 16 h NQO-Exposition das Niveau der Kontrolle zu erreichen (Abb. 13a).

Schlussfolgerung:

Eine Expositionszeit von 2 h ist im vorliegenden Fall von NQO bei RTG-2-Zellen im Comet Assay optimal, weil damit sowohl eine maximale gentoxische Reaktion als auch eine ausreichend kurze Expositionszeit für einen Kurzzeit-Test erreicht wurde.

Medienaustausch:

Um den Rückgang der DNA-Schädigung nach der Expositionszeit von 2 h zu ermitteln, wurde in einer weiteren Reihe von Experimenten die NQO-Expositionslösung nach zweistündiger Inkubation entfernt und gegen Medium ausgetauscht und daraufhin wiederum der zeitliche Effektverlauf gemessen. Es zeigte sich ein vergleichbarer Verlauf wie bei Dauerinkubation (Abb. 13b).

Schlussfolgerungen/Interpretationen:

Zunächst bestätigte dies die Ergebnisse der Dauerinkubation. Darüber hinaus zeigte es, dass eine Entstehung neuer "Netto"-DNA-Schäden bei der Dauerinkubation nach zwei Stunden kaum noch stattfand. Wie weit Entstehung und Reparatur von Strangbrüchen dabei einander möglicherweise kompensierten, kann nicht gesagt werden. Möglicherweise war die reale NQO-Konzentration im Medium bei Dauerinkubation nach 2 h nur noch sehr gering, weil sich dann kein Unterschied gegenüber NQO-freiem Medium mehr zeigte. Zu dieser Hypothese eines Konzentrationsrückgangs wurden weitere Experimente durchgeführt (s.u.).

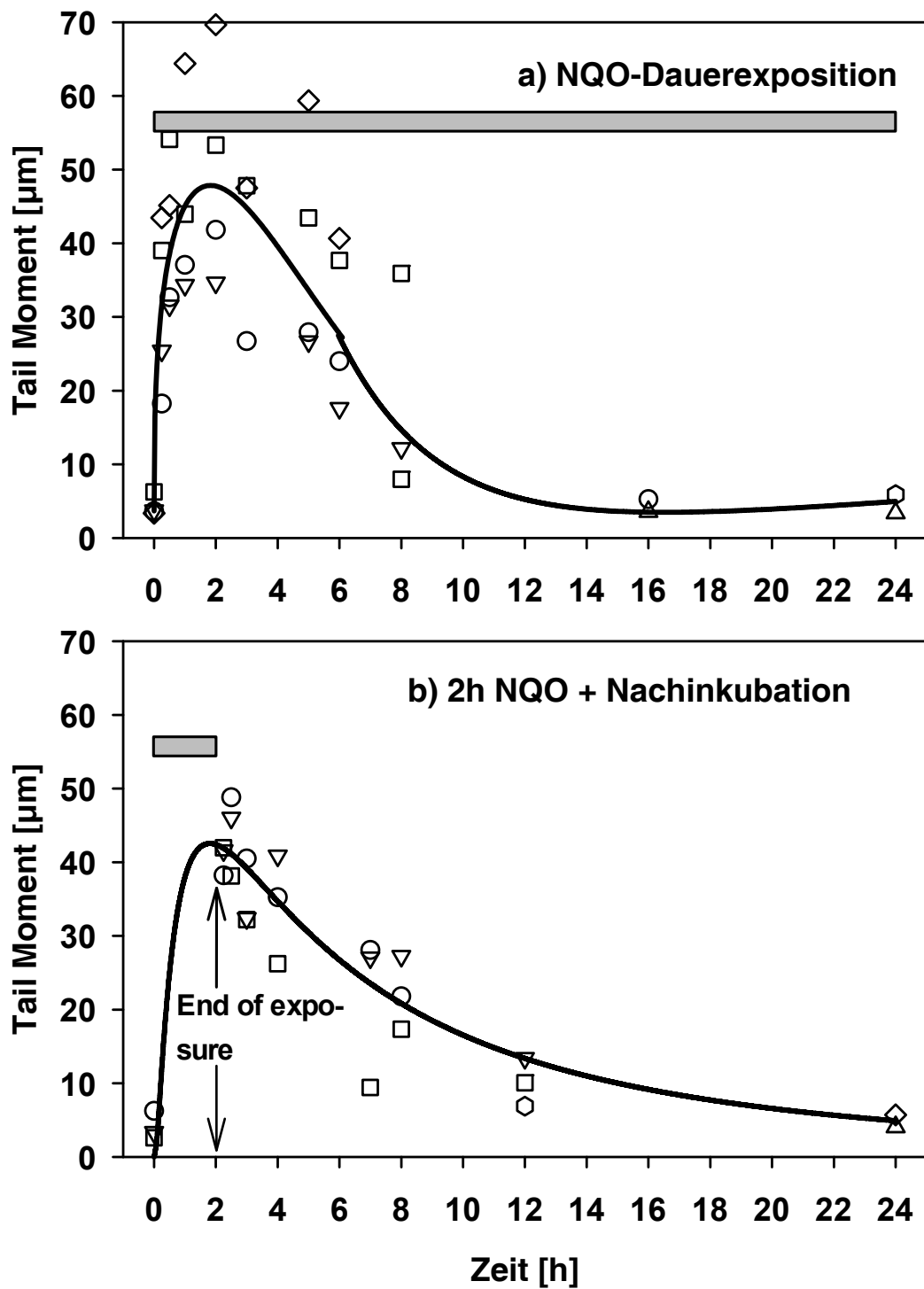


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf des gentoxischen Effekts von 40 $\mu\text{g/l}$ NQO an RTG-2-Zellen über einen Zeitraum von 24 h. a) Verlauf des gentoxischen Effekts bei Dauerexposition b) Abklingen des gentoxischen Effekts nach 2 h-Exposition. Die Datenpunkte für a) stellen jeweils Medianwerte aus 2-4 bzw. für b) aus 2-3 unabhängigen Experimenten dar. Die Einzelwerte sind in **Anhang 3** aufgeschlüsselt.

3.3.3 Experimente zu den zellbiologischen Ursachen der DNA-Schädigungskinetiken

Die Dauerinkubationsexperimente mit NQO warfen generell Fragen nach den Ursachen sowohl für die Entstehung als auch den Rückgang der DNA-Schäden im Comet Assay bei längerer Exposition (ab ca. 3 h) auf. Die Ursachen mussten hauptsächlich in einem oder mehreren der folgenden drei Prozesse liegen: (1) dem zellulären NQO-Metabolismus, der sowohl Aktivierung als auch Abbau von NQO beinhaltet, (2) der DNA-Reparatur in den Zellen und (3) dem abiotischen Zerfall von NQO im Medium.

3.3.3.1 Die Rolle des metabolischen Abbaus von NQO: Transfer-Experimente mit der Expositionslösung

Das Ergebnis, dass die Schädigungskinetiken einen fast gleichen Verlauf zeigten, wenn NQO für nur 2 h oder aber für 24 h auf den Zellen belassen wurde (Abb. 13), wies auf einen möglichen metabolischen Abbau von NQO hin. Dieser Abbau wurde auf eine einfache Weise überprüft, indem Expositionsmedium (40 $\mu\text{g/l}$ NQO) von einer Zellkultur nach 2- bzw. 6-stündiger Expositionszeit auf eine frische, bisher unbelastete Zellkultur übertragen wurde. Diese zweite Exposition wurde dann "standardmäßig" für 2 h durchgeführt. Der Versuch sollte zeigen, ob die Konzentration an biologisch wirksamem NQO im Medium in Gegenwart von Zellen signifikant abgenommen hatte. Das zellkonditionierte Medium induzierte nach vorausgegangener, 2-stündiger Exposition nur noch einen sehr geringen ($n=2$), nach 6 h Vorexposition ($n = 1$) keinerlei gentoxischen Effekt mehr (ohne Abb.). Als Kontrolle wurde NQO-Medium eingesetzt, das für 2, 6 oder gar 22 h ($n = 1/2/1$ respektive) in den Mikrotiterplatten ohne Gegenwart von Zellen belassen worden war. Dieses Medium besaß in allen Fällen noch volle Wirksamkeit.

Schlussfolgerungen:

Mit den Versuchen wurde gezeigt, dass NQO im Expositionsmedium während eines Zeitraums von 22 h nicht abiotisch zerfiel. Dagegen gab es in Anwesenheit von Zellen eine Abnahme an biologischer Wirksamkeit, die offenbar einen Konzentrationsrückgang von NQO im Medium widerspiegelte. Das NQO wurde im Falle der 2- bzw. 6-stündigen Zellexposition möglicherweise weitgehend von den Zellen zu nichtgentoxischen Produkten metabolisiert oder gebunden.

3.3.3.2 Inhibitionsversuche mit Aphidicolin zur Rolle der DNA-Reparatur

3.3.3.2.1 Bestimmung der Wirksamkeit und geeigneter Konzentrationen von APC und NQO

Der DNA-Polymerase- α -Inhibitor Aphidicolin (APC) bewirkte bei Kombination mit NQO und 2-stündiger Expositionszeit in bestimmten Fällen eine Verstärkung der gentoxischen Reaktion von NQO im Comet Assay (Abb. 14):

Eine APC-Konzentration von 29,4 $\mu\text{mol/l}$ erhöhte in 2-stündiger Exposition die Strangbruchrate von RTG-2-Zellen bei NQO-Konzentrationen, die auch ohne APC-Zusatz

schon stark wirksam waren (20 und $40 \mu\text{g/l} = 0,11$ bzw. $0,22 \mu\text{mol/l}$). Dieser Effekt war statistisch signifikant (Mann-Whitney Rangsummentest, $p \leq 0,001$). Bei Einsatz niedrigerer APC-Konzentrationen von $14,7 \mu\text{mol/l}$ und der an der Nachweisgrenze liegenden NQO-Konzentration von $4,75 \mu\text{g/l}$ (s. 3.4.4) wurde keine signifikante Vermehrung von Strangbrüchen gegenüber NQO ohne Inhibitor bewirkt.

Die Ergebnisse und Schlüsse daraus kann man wie folgt zusammenfassen:

- Nach 2 h NQO-Exposition führte die Inhibition der DNA-Polymerase α durch APC zu einer Zunahme der DNA-Strangbrüche gegenüber NQO ohne Inhibitor. Wahrscheinlich ist diese Steigerung darauf zurückzuführen, dass in den inhibierten Zellen Schäden nicht entfernt wurden. Dies deutet auch an, dass die DNA-Reparatur in RTG-2-Zellen ohne Inhibitor zu diesem Zeitpunkt bereits eingesetzt hatte (s. Diskussionsteil).
- Die APC-Konzentration von $29,4 \mu\text{mol/l}$ zeigte in Kombination mit NQO signifikante Wirksamkeit und wurde daher für weitere Versuche als gut geeignet (besser als $14,7 \mu\text{mol/l}$) angenommen und eingesetzt (höhere Konzentrationen mögen wirksam sein, wurden aber hier nicht getestet).
- Die vorangegangenen Schlussfolgerungen wurden abgesichert: Um ausschließen zu können, dass die Effektsteigerung durch eine gentoxische Wirkung von APC selbst verursacht wurde, wurden Kontrollversuche unternommen, die bestätigten, dass APC allein keine im Comet Assay detektierbaren DNA-Schäden hervorruft, ausschließlich die Kombination mit NQO führte zur Effektsteigerung (s. z. B. Abb. 15).

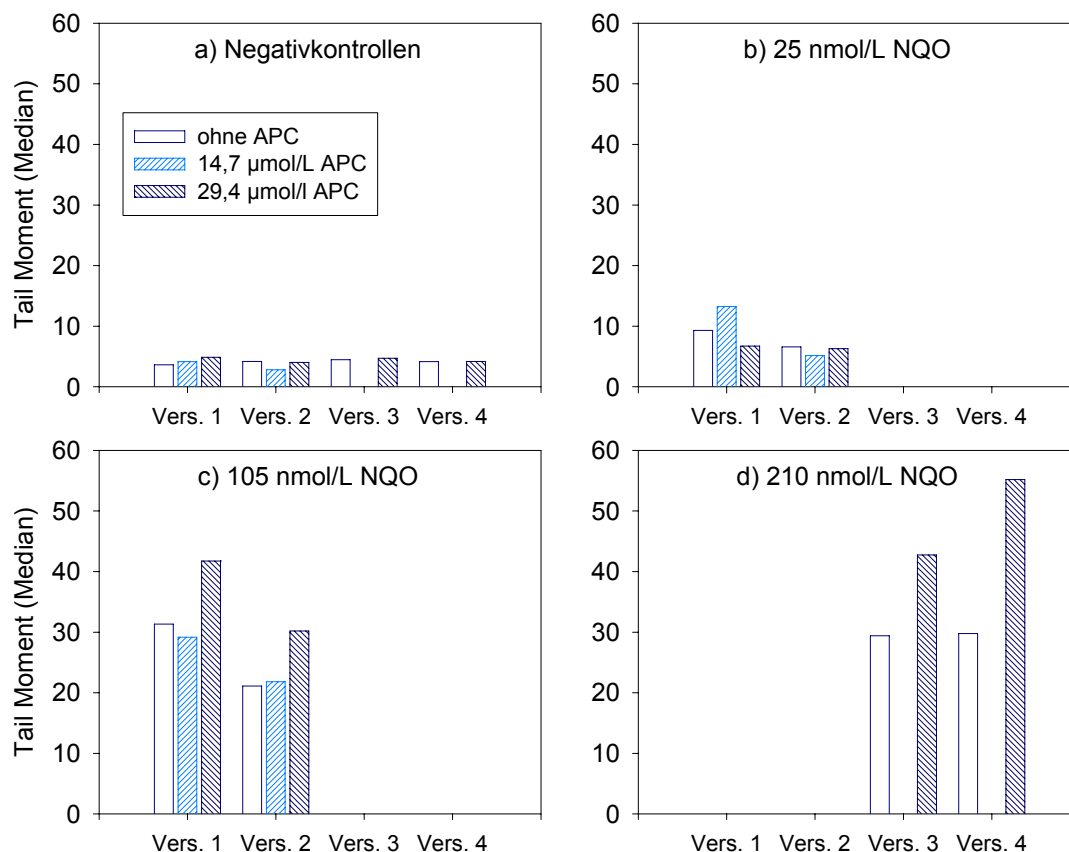


Abbildung 14: Comet Assay an RTG-2-Zellen bei Kombination von NQO mit Aphidicolin (APC). 2 h Expositionszeit. Es sind Daten aus 4 Versuchen dargestellt. a) Negativkontrollen b)-d) verschiedene Konzentrationen von NQO in Kombination mit 0; 14,7 µmol/l und 29,4 µmol/l APC. Alle Werte in b)-d) zeigen signifikant erhöhte Werte gegenüber den jeweiligen Negativkontrollen in a). Außerdem sind die Werte der mit 29,4 µmol/l APC behandelten Zellen in Kombination mit 20 und 40 µg/l NQO signifikant größer als die der nicht-APC-behandelten Zellen.

3.3.3.2 Expositions kinetiken bei NQO/APC-Kombination

Im Folgenden wurden NQO-APC-Kombinationen mit unterschiedlich gewählten Expositionszeiten durchgeführt, um die Rolle von DNA-Reparaturprozessen bei der Entstehung und dem Rückgang der DNA-Schäden weiter zu untersuchen.

Die Versuche zeigten, dass APC den Rückgang von DNA-Strangbrüchen inhibierte, solange es im Medium vorhanden war: Die im Comet Assay angezeigte Reaktion (Tail Moment) auf NQO ohne APC war bei 2 h geringer als mit APC (Abb. 15a) und war nach 8 h stark abgeklungen – dies war der Fall bei NQO-Dauerinkubation oder auch wenn eingesetztes NQO nach 2 h entfernt wurde (Abb. 15c bzw. 35b). Dagegen blieb sie bei fortgesetzter Inkubation mit APC über 8 h in Kombination mit NQO (Abb. 15c) und selbst nach Auswaschen (Medium absaugen u. 2 Mal mit PBS spülen) von NQO nach 2 h unter Beibehaltung von APC (Abb. 15b) gleich stark. APC allein hatte bei 8 h-Inkubation keine gentoxische Wirkung.

APC erwies sich also über den Zeitraum von mindestens 8 h als wirksamer Inhibitor der DNA-Reparatur in RTG-2-Zellen. Die Zunahme von DNA-Schäden durch APC-Zusatz bereits nach 2 h wies darauf hin, dass schon nach dieser Zeit Reparaturprozesse begonnen hatten, die ohne APC-Behandlung den Schaden nach dieser Zeit bereits reduzierten.

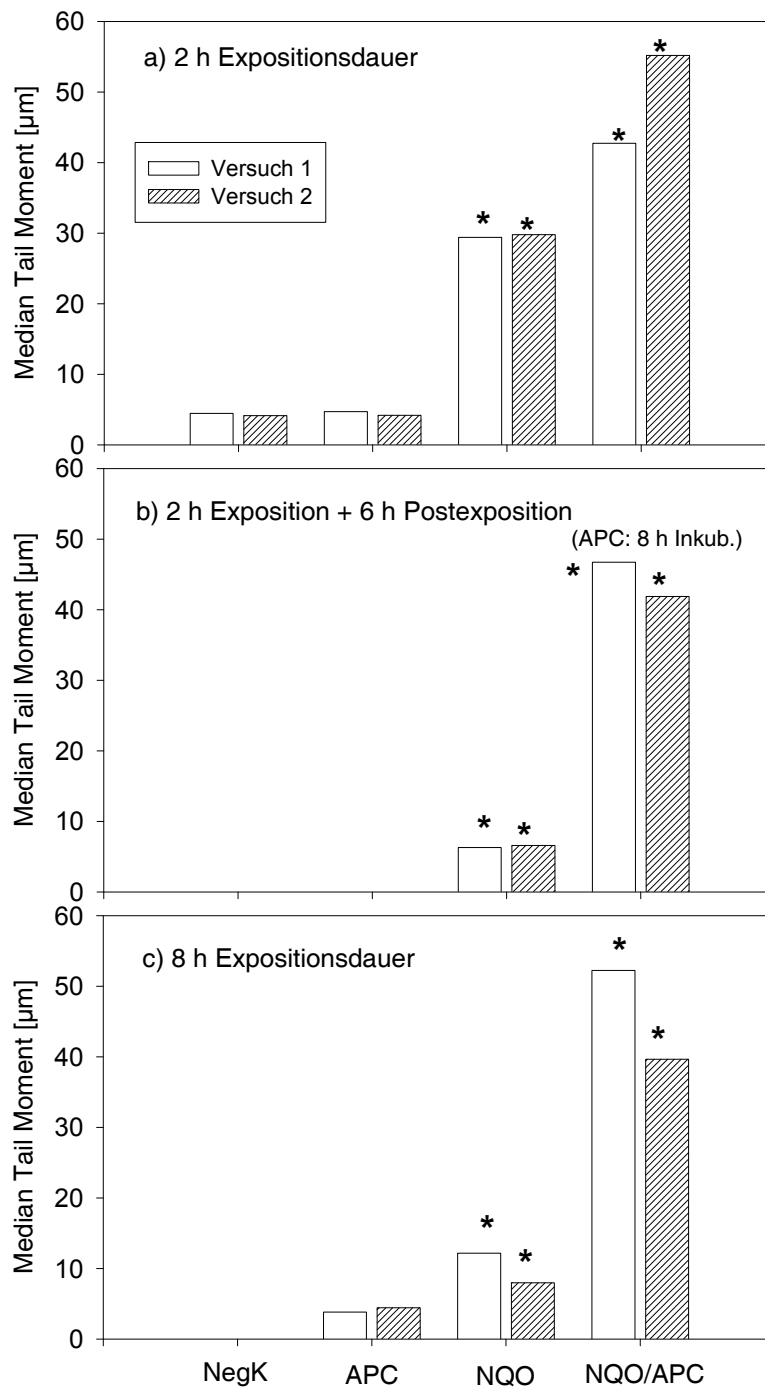


Abbildung 15: Kombination von NQO (40 µg/l) mit Aphidicolin (APC) (29,4 µmol/l) über verschiedene Expositionszeiten im Comet Assay an RTG-2-Zellen. Daten aus 2 Versuchen, jeder Balken repräsentiert einen Versuch. *: signifikant höher als die Negativkontrolle. a) 2 h Expositionsdauer b) NQO: 2 h Exposition + 6 h Postexposition; APC: 8 h durchgängige Exposition c) 8 h Expositionsdauer.

3.3.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen zu den zeitabhängigen Experimenten

Eine Expositionszeit von 2 h ist (im Falle von NQO) für die Verwendung von RTG-2-Zellen im Comet Assay optimal, da dann eine maximale Reaktion auftritt und diese relativ kurze Zeit auch den praktischen Anforderungen an einen Kurzzeit-Test entspricht. Aus diesem Grund wurden 2 h in der vorliegenden Arbeit als Standard-Expositionszeit gewählt.

Die DNA-Strangbrüche entstanden vorwiegend während der ersten 2-3 h. NQO wurde während dieser ersten Phase von RTG-2-Zellen wahrscheinlich zum größten Teil metabolisiert oder gebunden, denn seine Wirkung im Medium nahm stark ab, wie Versuche mit zellkonditioniertem Medium an weiteren Zellen zeigten.

Die oben gezeigten Inkubationskinetiken mit NQO und Kombinationsversuche von NQO mit Aphidicolin an RTG-2-Zellen zeigten, dass der im Comet Assay detektierbare DNA-Schaden repariert wurde (innerhalb von 4-8 h zu 50 % und nach 15-24 h vollständig). Die DNA-Reparatur setzte in RTG-2-Zellen bereits ein, bevor 2 h exponiert wurde. APC kann diese Reparatur über mindestens 8 h offensichtlich vollkommen unterbinden. Offensichtlich sind in RTG-2-Zellen die durch APC gehemmten DNA-Reparaturenzyme (z. B. DNA-Polymerase α) für die NQO-Schadensreparatur essenziell. Die Möglichkeit, dass DNA-Schäden durch APC allein induziert wurden, wurde durch Kontrollversuche ausgeschlossen, wobei dies in Einklang mit Veröffentlichungen an Humanzelllinien steht (Bock et al. 1998; Speit & Hartmann 1995).

3.4 Einzelsubstanztests

3.4.1 Zytotoxizität

Wie bereits unter 2.6.2 angezeigt, war keine der Monosubstanzen im getesteten Konzentrationsbereich nach 2 h Expositionszeit zytotoxisch im FDA/EB-Test.

3.4.2 Ansprechbarkeit, Sensitivitäten und Dosis-Wirkungs-Kurven

3.4.2.1 Definition des Sensitivitätsbegriffs

In vorangegangenen Abschnitten wurde bereits mehrfach der Begriff der **Sensitivität** erwähnt, außerdem, dass es ein erwünschtes Ziel einer Testoptimierung ist, dass der Assay eine möglichst hohe Sensitivität erreicht. Der Sensitivitätsbegriff soll hier genauer erläutert werden: Bei der Beschreibung der Reproduzierbarkeit wurde bereits erwähnt, dass die LOEC (engl.: **L**owest **O**bserved **E**ffect **C**oncentration) als Ausdruck für die Sensitivität benutzt werden kann (Kapitel 3.2.3.4): der LOEC-Wert könnte auch als das Detektionslimit des Testsystems für eine bestimmte Substanz bezeichnet werden. Je niedriger das Detektionslimit ist, desto größer ist die Sensitivität des Tests für diese Substanz. Die Bestimmung von LOEC-Werten erfolgt durch schrittweise Näherung des getesteten Konzentrationsbereichs in immer feineren Abstufungen von der gerade noch

wirksamen zur gerade nicht mehr wirksamen Konzentration und ist daher auch mit Problemen behaftet (z. B. Aufwand und Variabilität). In Rand (1995 , S. 596) wird Sensitivität generell als Ausdruck des Verhältnisses eines Signals gegenüber einem Hintergrundrauschen (signal-to-noise ratio) beschrieben, wobei der interessierende Effekt groß genug sein muss, um von der normalen Variation unterschieden werden zu können.

Die beschriebene Unterscheidung des Effekts vom "Rauschen" ist in der vorliegenden Arbeit durch den Vergleich der Effekte behandelter Proben mit den Negativkontrollen und den Signifikanztest vorgenommen worden. Das Ziel der Sensitivitätssteigerung als Optimierungsmaßnahme wurde durch entsprechende Veränderung von Testbedingungen und Auswertungsmethodik verfolgt, wie in der Untersuchung zur Elektrophoresedauer (Kap. 3.1.2) und zu den Bildanalyseparametern (Kap. 3.1.3) dargestellt wurde. Es ergab sich aber das Problem der Beschreibung und Bewertung der Sensitivität. In der Literatur zum Comet Assay ist oft von einem "hochsensitiven" Testsystem die Rede, und diese Formulierung wurde hier manchmal mit einer gewissen Willkürlichkeit übernommen. Es sollte zum einen klar sein, dass Sensitivität in Bezug auf jede einzelne Substanz bzw. Probe gesehen werden muss und daher der Begriff nicht so verallgemeinerbar ist, wie er zum Teil benutzt wird. - Es herrscht wohl bisher keine zwingende Übereinkunft darüber, aber als Maßstab sollte man hier wohl die molare Konzentration der jeweiligen Substanz in der Probe annehmen. - Zum anderen geht als zweiter Maßstab in eine solch wertende Bezeichnung der Vergleich zu anderen, bisher bekannten Testsystemen ein. Wie unter 4.2.1.1, Tab. 32 gezeigt werden wird, ist die Bezeichnung "hochsensitiv" für die Substanz NQO im Comet Assay nur relativ zu anderen Gentoxizitätstests mit gleichem oder ähnlichem Endpunkt nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft gerechtfertigt. Diese Bewertung ist aber nicht absolut und zeitlos zu sehen, da meines Wissens keine quantitativ festgelegten Kriterien für solche Bewertungen definiert wurden. Dies sollte im Folgenden immer im Gedächtnis behalten werden, und in diesem Sinne ist in den folgenden Abschnitten der Substanzvergleich zu verstehen.

An dieser Stelle soll auch der Begriff der **Auflösung** kurz definiert werden: Unter Auflösung versteht man die Differenz der Reaktion zwischen zwei Konzentrationspunkten. Hier gilt natürlich, dass diese Differenz auf signifikanten Reaktionsunterschieden zwischen den Konzentrationspunkten beruht. Eine "Streckung" der Reaktionskurve durch reine Multiplikation mit einem konstanten Faktor würde also keine Erhöhung der Auflösung bedeuten.

3.4.2.2 Überblick: verwendete Zellsysteme und Chemikalien

Bei zweistündiger Exposition der drei Zellsysteme RTG-2, RTG-2 mit Rattenleber-S9 und RTL-W1 an jeweils sechs Chemikalien AAF, BaP, DMNA, NF, NQO und MNNG zeigten sich unterschiedliche Antwortmuster der Gentoxizität im Comet Assay. In den Abbildungen 12-21 sind die Dosis-Wirkungsverläufe für jeweils drei Einzeltests je Substanz und Zellsystem dargestellt. Tabelle 13 fasst die Ergebnisse für die unterschiedlichen Substanzen und Zellsysteme anhand der Nachweisgrenzen zusammen. Auf Eigenschaften und Metabolismus der Substanzen wird in der Diskussion unter 4.2.1 eingegangen.

3.4.2.3 RTG-2-Zellen

3.4.2.3.1 RTG-2 / NQO

In den vorangegangenen Abschnitten (3.2.2 u. folgende) wurden bereits Dosis-Wirkungsverläufe und Nachweisgrenzen des gentoxischen Agens NQO bei RTG-2-Zellen anhand einer breiteren Datenbasis als für die übrigen Einzelsubstanzen besprochen. Aus Gründen der Einheitlichkeit und Vergleichbarkeit werden hier - wie bei den anderen Monosubstanzen - auch für NQO jeweils drei Einzelversuche als Boxplots gezeigt (Abb. 16), die ausführlichen NQO/RTG-2-Experimente sollten zusätzlich den entsprechenden Abschnitten und Abbildungen (z. B. Abb. 12) entnommen werden.

RTG-2-Zellen waren sehr sensitiv (zum Sensitivitätsbegriff s. 3.4.2.1) für NQO: Die Nachweisgrenze lag bei 25 nmol/l (4,75 µg/l) (Datenbasis n = 3 Versuche; Abb. 16) bzw. bei 13-25 nmol/l (2,5-4,75 µg/l) (Datenbasis n = 11 Versuche; Tab. 9). Durch eine längere Elektrophoresedauer von 35 min gegenüber 20 min wurde die Steigung der NQO-Dosis-Wirkungskurve erhöht, die Nachweisgrenze wurde dadurch jedoch nicht signifikant gesenkt (Abb. 8 und Kap. 3.1.1).

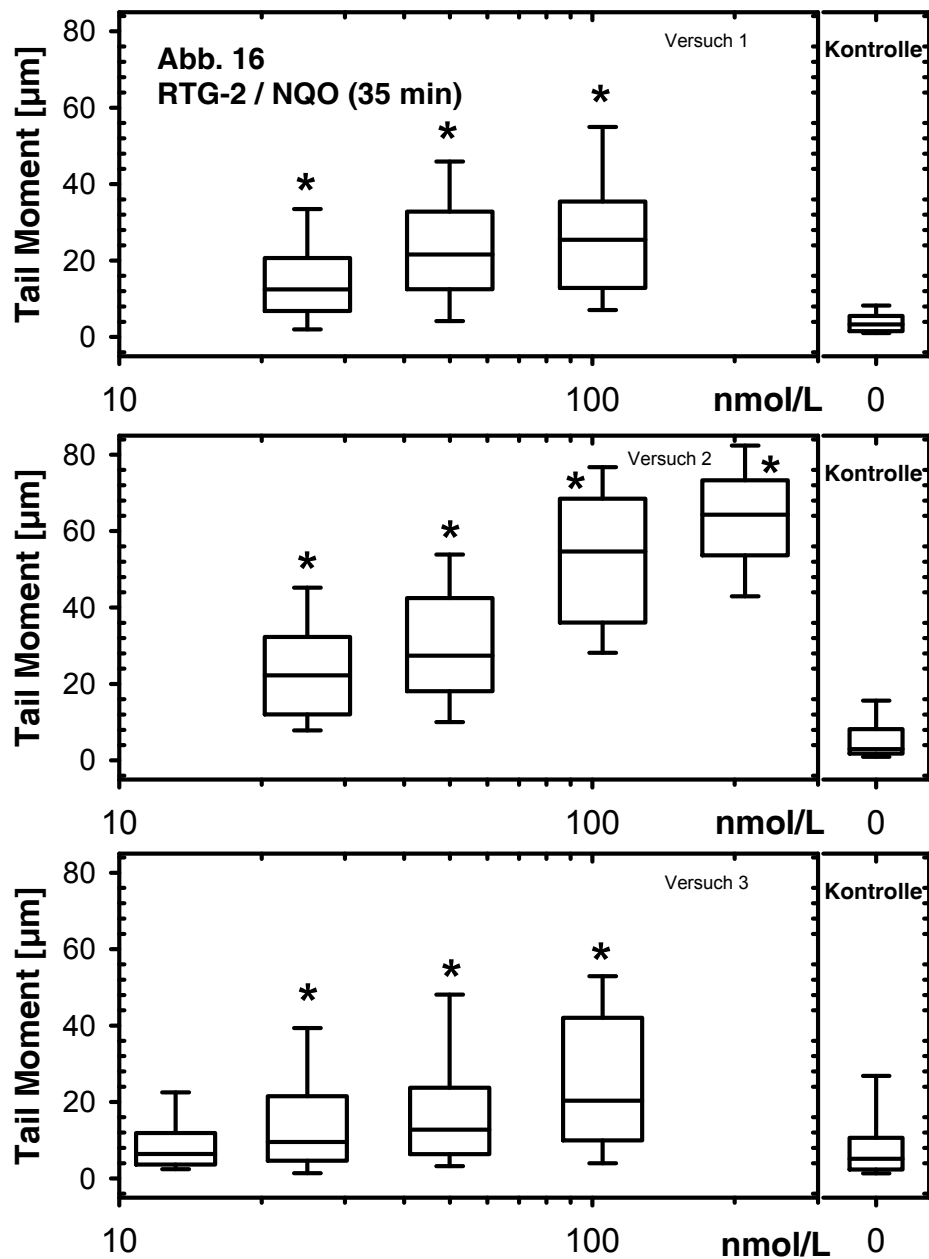


Abbildung 16: Gentoxizität (ausgedrückt als Tail Moment) von NQO (2 h Expositionszeit) im Comet Assay mit RTG-2-Zellen. Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die gezeigten Kontrollen sind Negativkontrollen. 35 min Elektrophoresedauer (Vgl. 20 min Elektr. Abb. 17).

3.4.2.3.2 RTG-2 / AAF

AAF rief bei RTG-2-Zellen über den getesteten, weiten Konzentrationsbereich keine gentoxische Reaktion im Comet Assay hervor (Abb. 17).

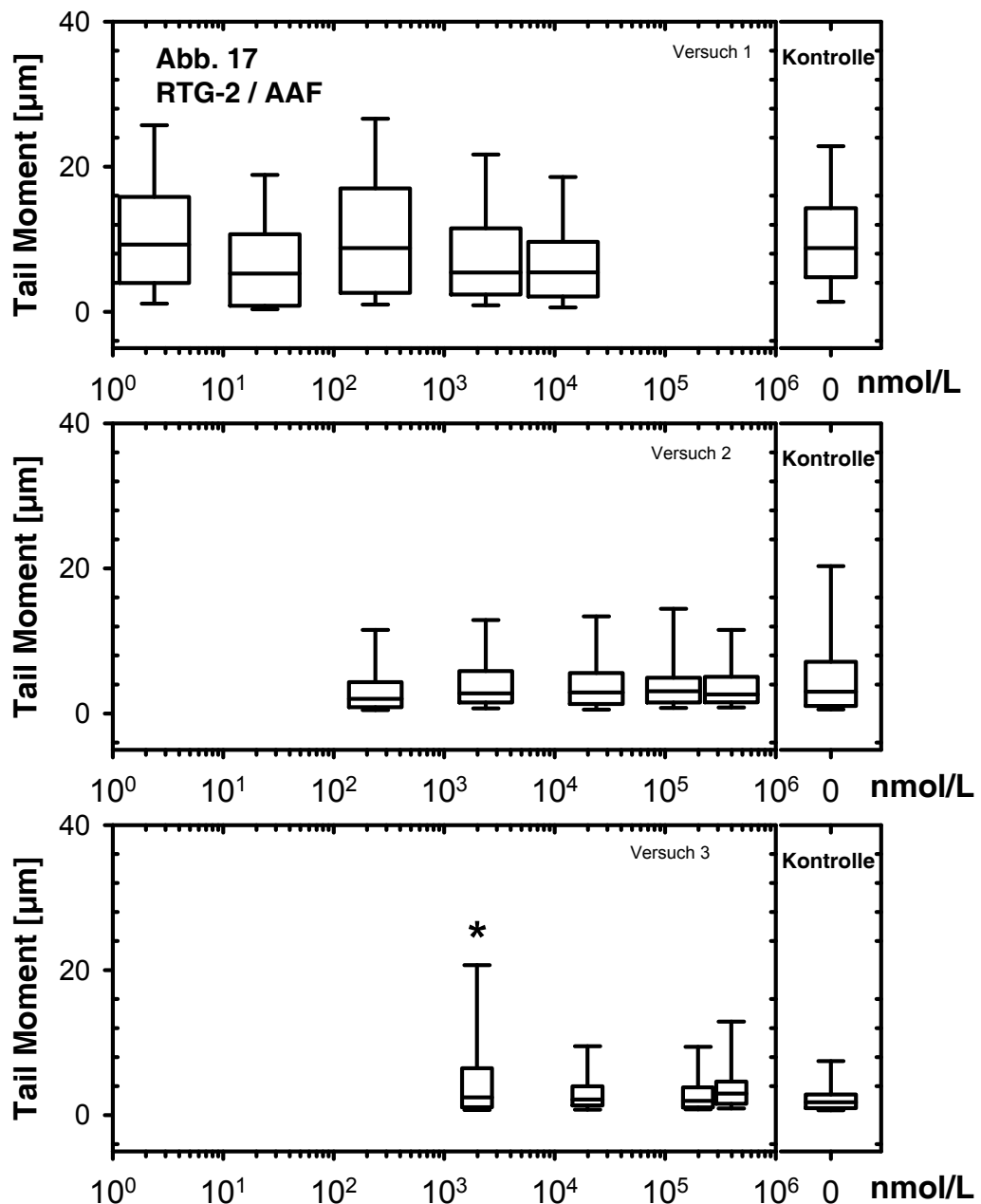


Abbildung 17: Gentoxizität (ausgedrückt als Tail Moment) von AAF (2 h Expositionszeit) im Comet Assay mit RTG-2-Zellen. Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die gezeigten Kontrollen sind Negativkontrollen. 20 min Elektrophoresedauer.

3.4.2.3.3 RTG-2 / BaP

Eine Gentoxizität von BaP bei RTG-2-Zellen ließ sich erst ab Konzentrationen von 2,4-4,8 $\mu\text{mol/l}$ (600-1200 $\mu\text{g/l}$) feststellen. Diese Konzentrationen liegen bereits über der Wasserlöslichkeitsgrenze von BaP. Der Anstieg der Dosis-Wirkungskurve ist über einen weiten Konzentrationsbereich nur flach. Aus diesem Grund wurden nur wenige (minimale und maximale) Konzentrationen getestet (Abb. 18).

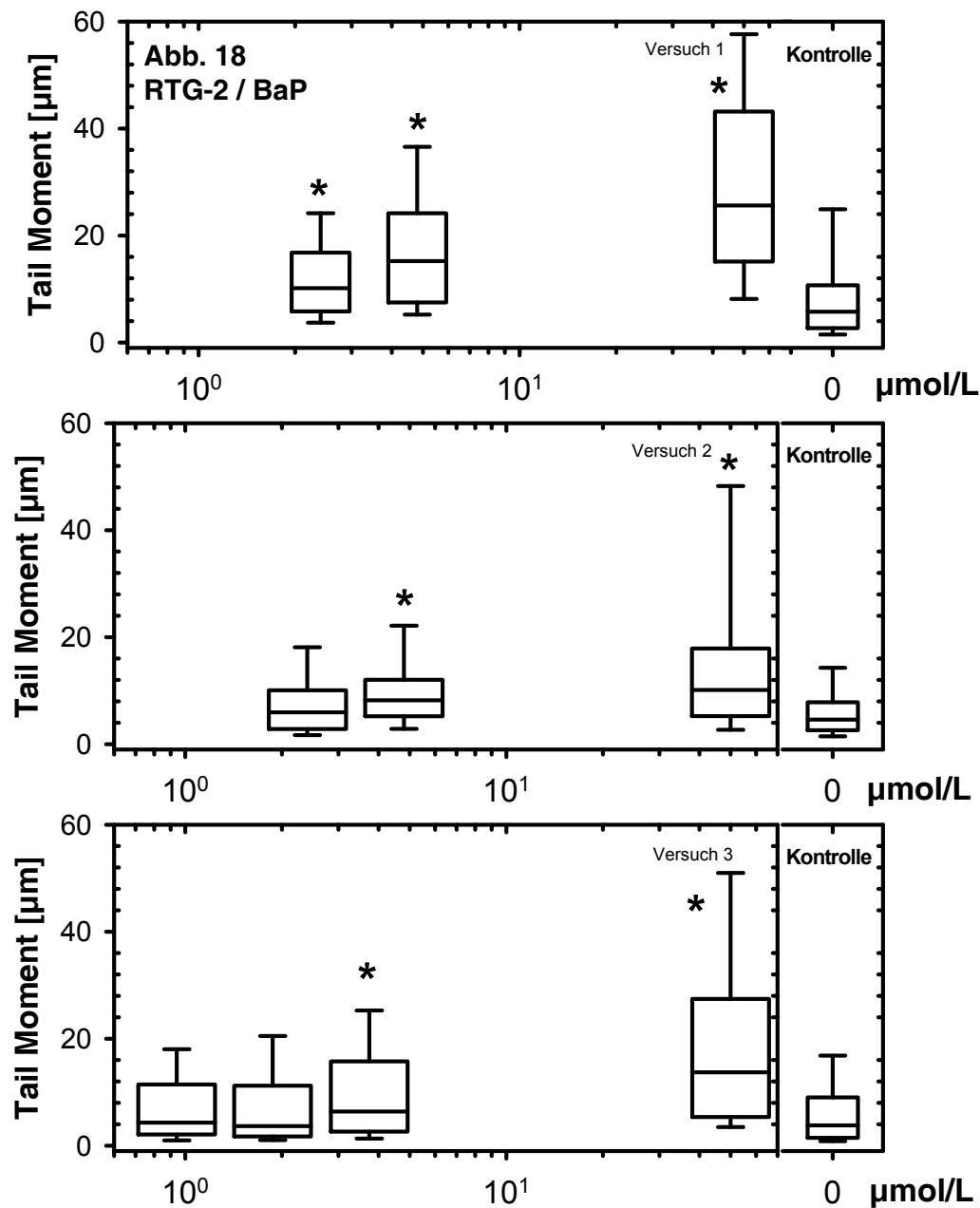


Abbildung 18: Gentoxizität (ausgedrückt als Tail Moment) von BaP (2 h Expositionszeit) im Comet Assay mit RTG-2-Zellen. Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die gezeigten Kontrollen sind Negativkontrollen. 35 min Elektrophoresedauer.

3.4.2.3.4 RTG-2 / DMNA

Bis auf einen Einzelversuch, bei dem die höchste Konzentration leicht ansprach, rief DMNA über einen weiten Konzentrationsbereich keine gentoxische Reaktion im Comet Assay an RTG-2-Zellen hervor (Abb. 19).

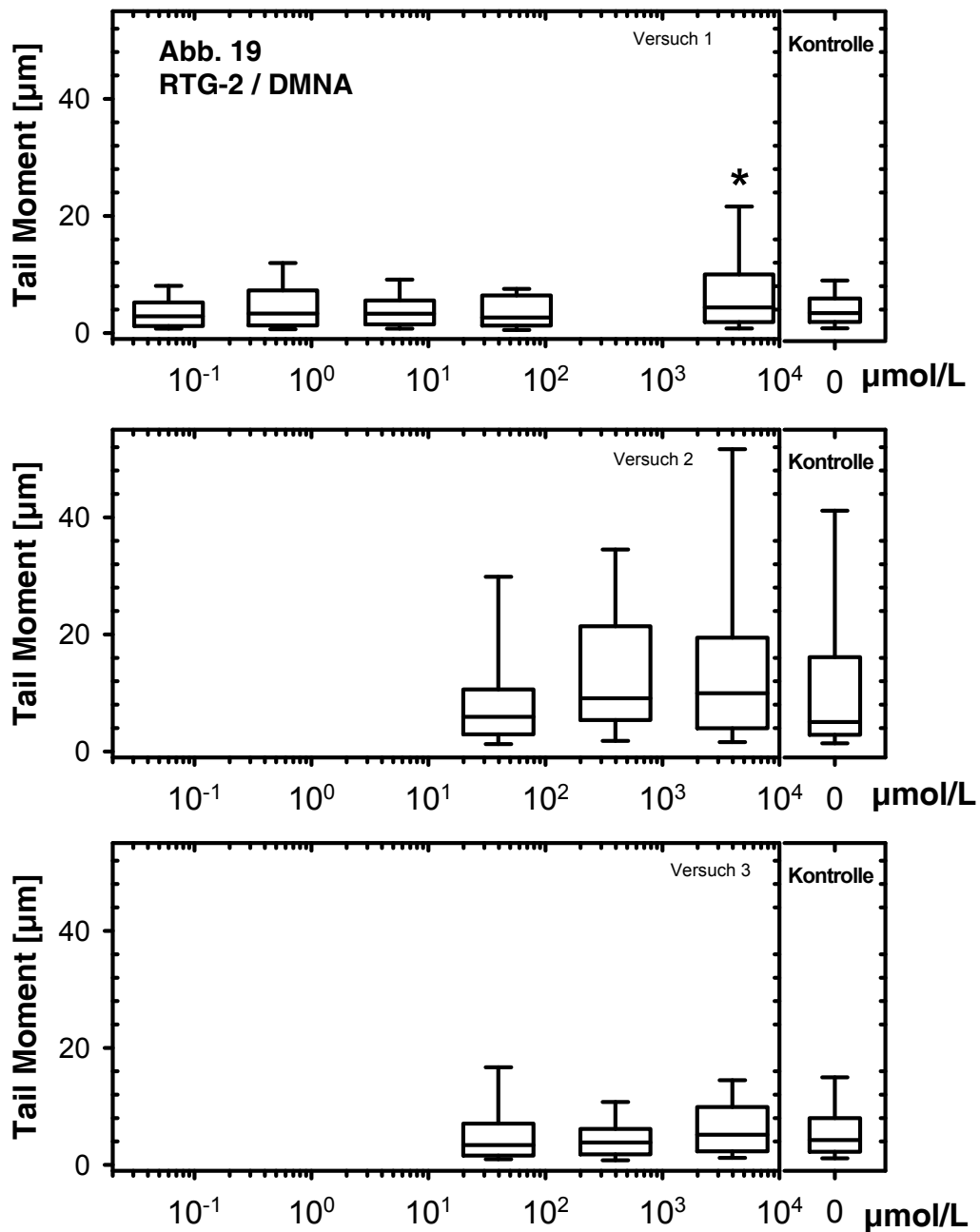


Abbildung 19: Gentoxizität (ausgedrückt als Tail Moment) von DMNA (2 h Expositionszeit) im Comet Assay mit RTG-2-Zellen. Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die gezeigten Kontrollen sind Negativkontrollen. Von oben nach unten: 20 min, 35 min, 35 min Elektrophoresedauer.

3.4.2.3.5 RTG-2 / NF

NF wirkte im Konzentrationsbereich ab $130 \mu\text{mol/l}$ (30 mg/l) gentoxisch auf RTG-2-Zellen (Abb. 20). Im Vergleich zu den anderen getesteten Substanzen war diese Konzentration relativ hoch, also waren die RTG-Zellen nicht besonders sensibel, jedoch

war der Anstieg der Dosis-Wirkungskurve nach Überschreitung dieser Schwelle dann relativ steil.

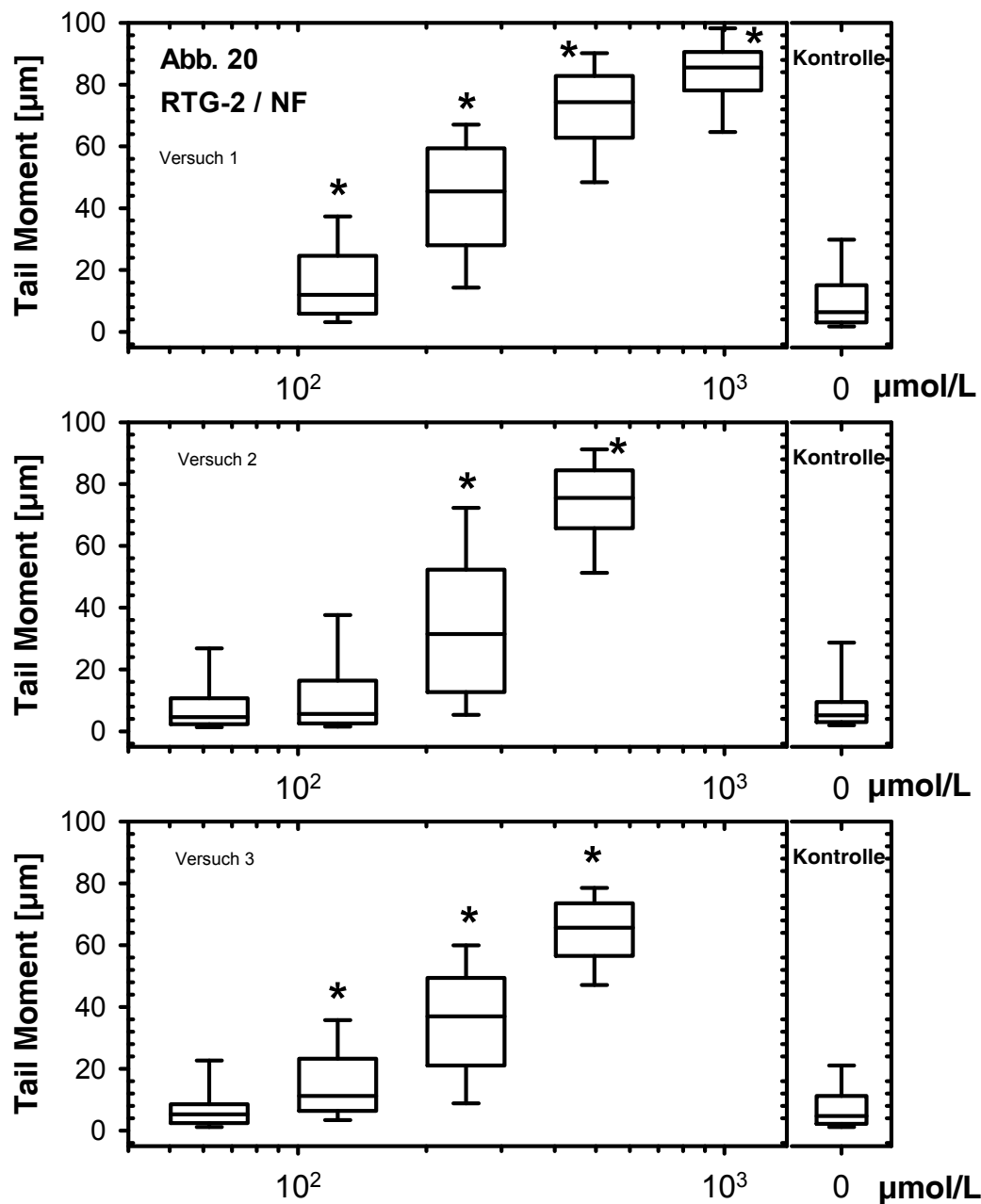


Abbildung 20: Gentoxizität (ausgedrückt als Tail Moment) von NF (2 h Expositionszeit) im Comet Assay mit RTG-2-Zellen. Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die gezeigten Kontrollen sind Negativkontrollen. 35 min Elektrophoresedauer.

3.4.2.3.6 RTG-2 / MNNG

Für MNNG zeigte das Testsystem eine hohe Sensitivität (wobei die LOEC-Werte allerdings über denen für NQO lagen): 68-136 nmol/l (10-20 µg/l) (Abb. 21).

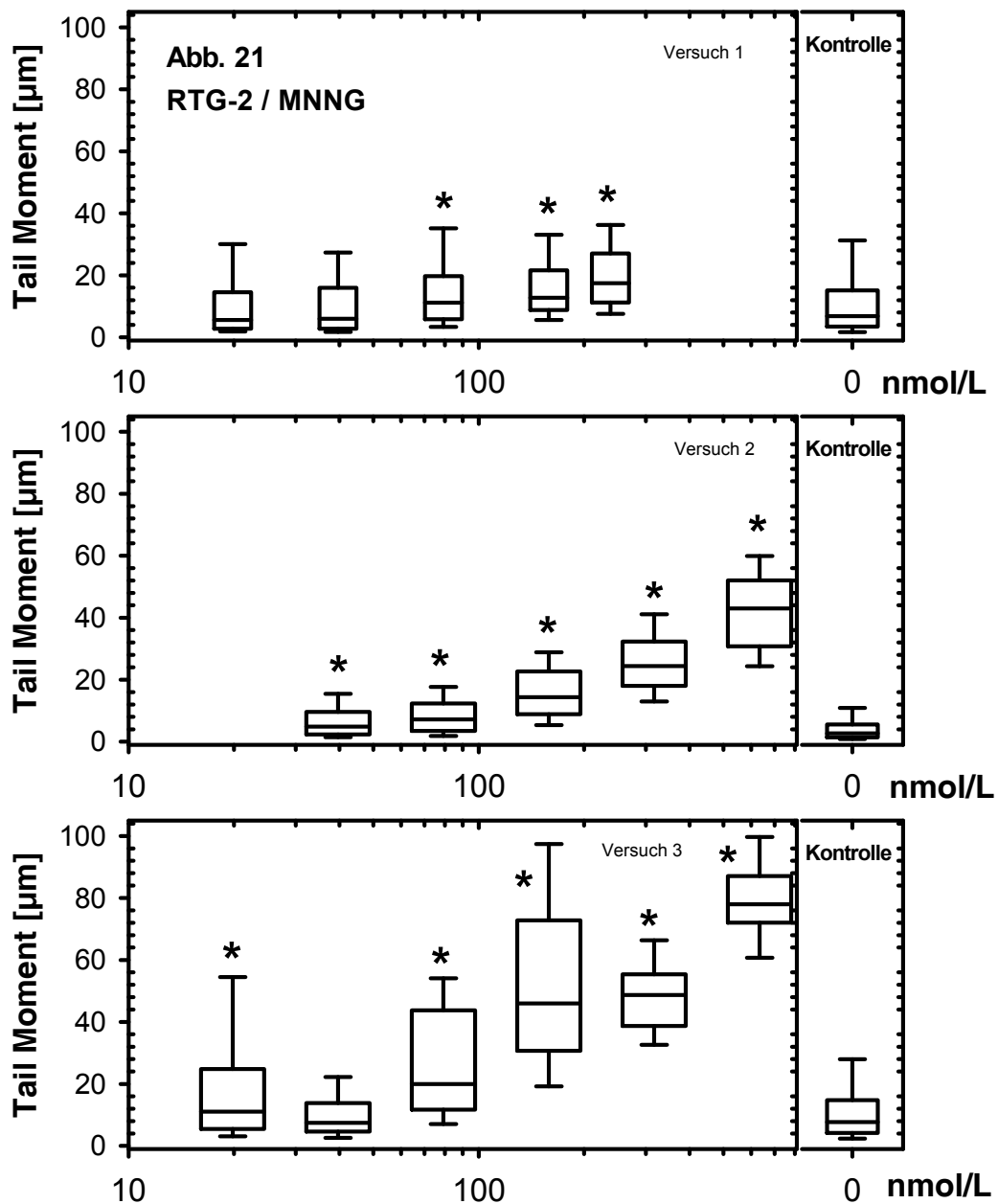


Abbildung 21: Gentoxizität (ausgedrückt als Tail Moment) von MNNG (2 h Expositionszeit) im Comet Assay mit RTG-2-Zellen. Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die gezeigten Kontrollen sind Negativkontrollen. 35 min Elektrophoresedauer.

3.4.2.4 RTG-2-Zellen mit S9-Zusatz

3.4.2.4.1 RTG-2 + S9 / BaP

Vorbemerkung:

Wie später genauer erläutert werden wird (s. 4.2.1.4), gehört BaP zu den indirekten Gentoxinen, die durch Phase I-Biotransformationsreaktionen, hauptsächlich in der Leber,

zu direkt gentoxischen Metaboliten umgesetzt werden. Um solche indirekten Gentoxine auch in Gentoxizitäts-Testsystemen, welche keine eigene Metabolisierungsaktivität aufweisen, detektieren zu können (z. B. dem bakteriellen Ames-Test), wird dort häufig S9-Überstand aus Leberhomogenat von Wirbeltieren zugesetzt. Hier wurde es aus ähnlichen Gründen verwendet, da Hinweise darauf bestehen, dass RTG-2-Zellen nur eine geringe interne Metabolisierungskapazität besitzen. Es sollte herausgefunden werden, ob durch S9-Zugabe die Gentoxizität gegenüber unbehandelten RTG-2-Zellen gesteigert werden kann. Entsprechende Versuche mit AAF und DMNA wären aus denselben Gründen angebracht, wurden hier aber aus Kapazitäts- und Zeitgründen nicht durchgeführt.

Die LOEC-Werte für RTG-2-Zellen lagen bei Zusatz von Rattenleber-S9 bei Konzentrationen von $0,9\text{-}3,7\ \mu\text{mol/l}$ ($236\text{-}943\ \mu\text{g/l}$) (Abb. 22). Zum Vergleich mit RTG-2-Zellen ohne S9-Zusatz und mit RTL-W1-Zellen siehe 3.4.3.2.

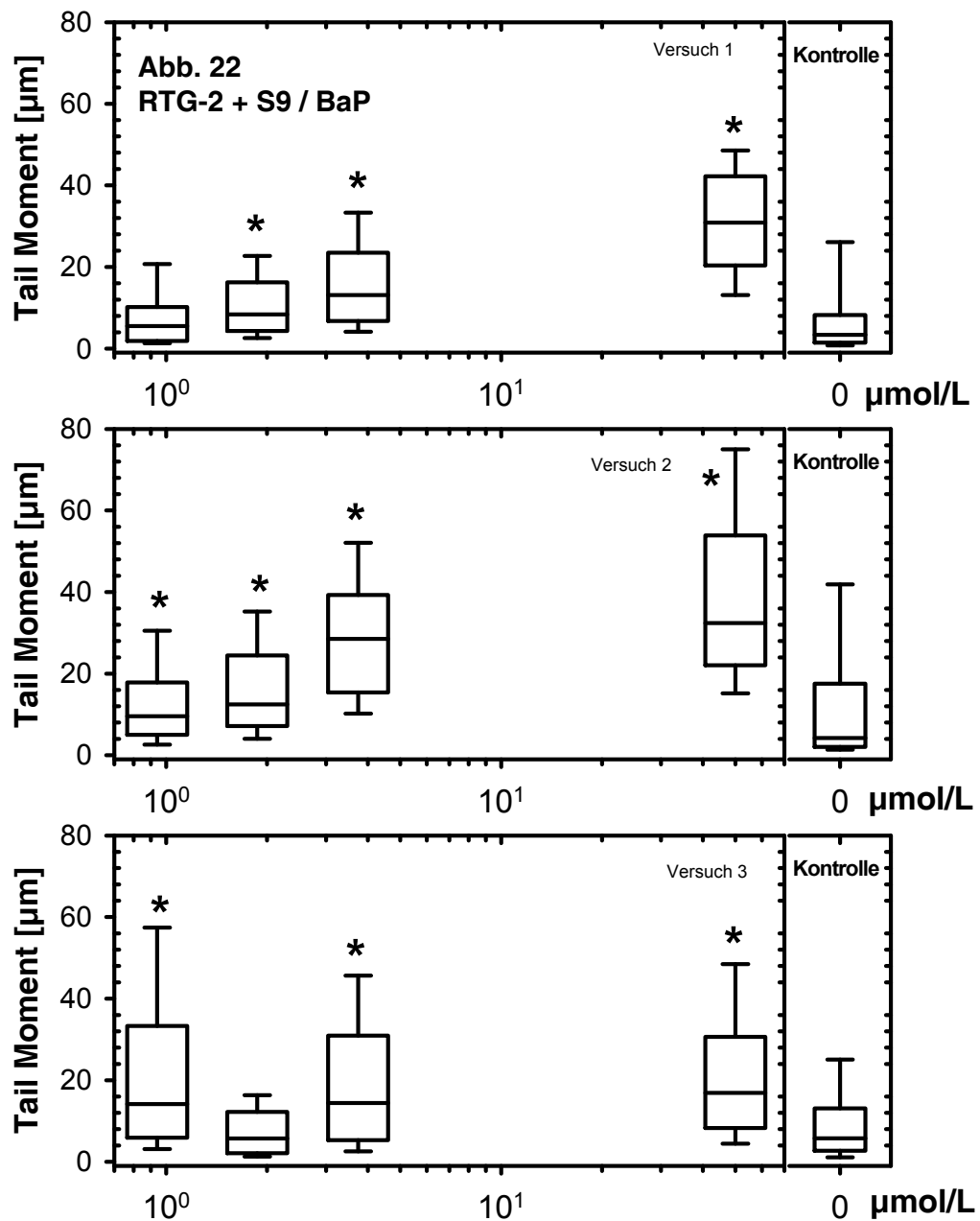


Abbildung 22: Genotoxizität (ausgedrückt als Tail Moment) von BaP (2 h Expositionszeit) im Comet Assay mit RTG-2-Zellen und Zusatz von 1 % S9 (0,244 mg Prot./ml). Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die gezeigten Kontrollen sind Negativkontrollen. 35 min Elektrophoresedauer.

3.4.2.5 β -Naphthoflavon-induzierte RTL-W1-Zellen

3.4.2.5.1 RTL-W1 / BaP

Vorbemerkung:

Aus ähnlichen Gründen wie bei der Verwendung von S9-Mix für RTG-2-Zellen mit BaP (s. 3.4.2.4.1), nämlich zum Zwecke der verstärkten Metabolisierung, wurden RTL-W1-Zellen, oder besser gesagt deren Cytochrom P450 1A1, vor der Behandlung mit β -Naphthoflavon induziert. Da Hinweise auf eine an sich schon stärkere interne Metabolisierungskapazität dieser Zellen gegenüber RTG-2-Zellen bestanden, sollte dieser mögliche Unterschied hier noch betont werden. Es sollte versucht werden, in wie weit mit Hilfe der internen metabolischen Aktivität der RTL-W1-Zellen womöglich ähnliche Effekte wie sonst nur durch Zugabe von externer metabolischer S9-Aktivierung, z. B. bei RTG-2-Zellen, erzielt werden konnten.

Die Zelllinie RTL-W1, vorinduziert mit β -Naphthoflavon, zeigte eine leicht höhere Sensitivität gegenüber BaP als die Zelllinie RTG-2: 1,9-2,4 $\mu\text{mol/l}$ (471-606 $\mu\text{g/l}$) (Abb. 23). Zum Vergleich mit RTG-2-Zellen mit und ohne S9-Zusatz siehe 3.4.3.2.

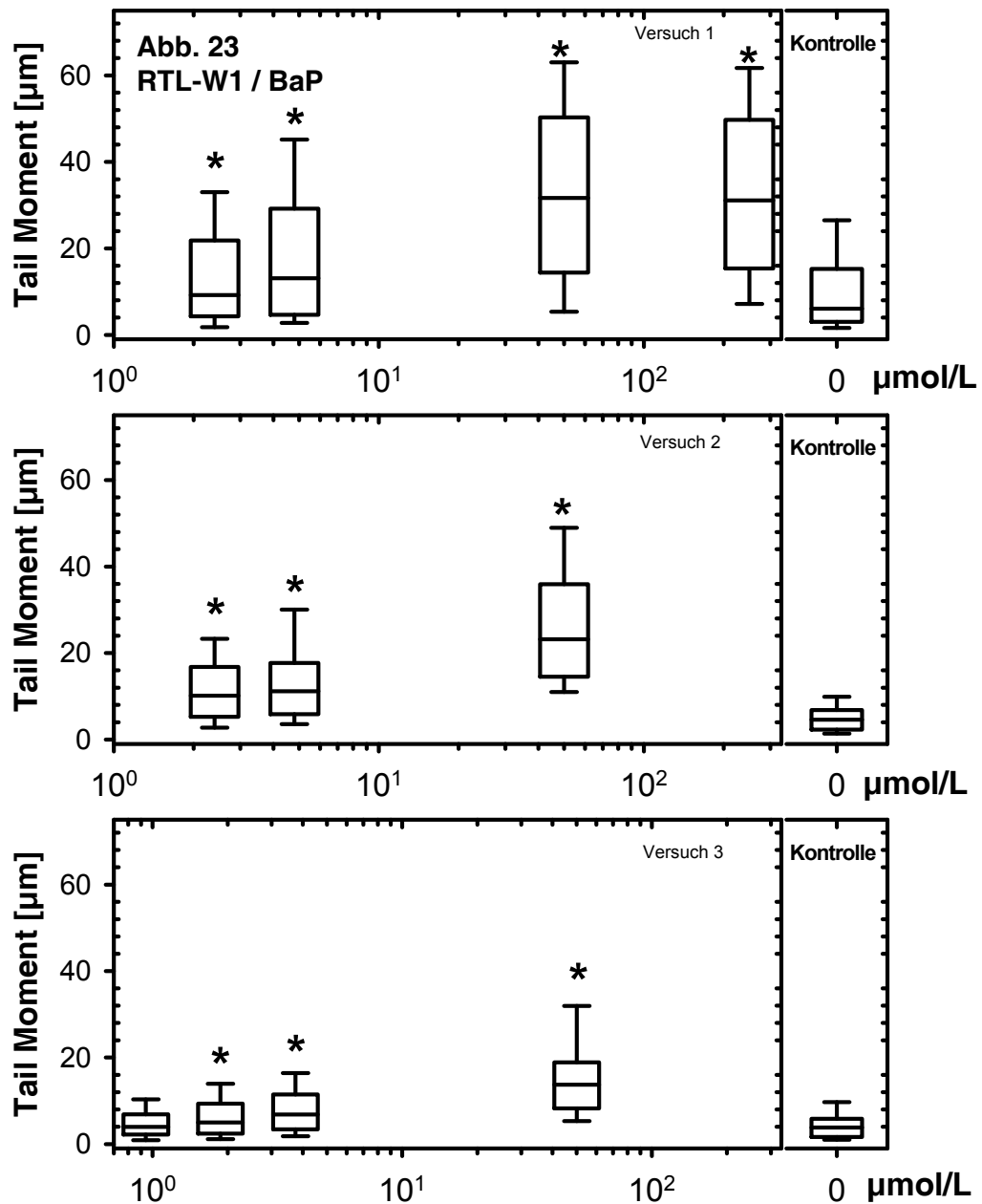


Abbildung 23: Gentoxizität (ausgedrückt als Tail Moment) von BaP (2 h Expositionszeit) im Comet Assay mit β NF-induzierten RTL-W1-Zellen. Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die gezeigten Kontrollen sind Negativkontrollen. 35 min Elektrophoresedauer.

3.4.2.5.2 RTL-W1 / NQO

Die Nachweisgrenze von NQO bei RTL-W1-Zellen lag bei RTL-W1-Zellen zwischen 13-105 nmol/l (2,5-20 μ g/l) (Tab. 13 u. Abb. 24). Andere Parameter wie die Stärke der gentoxischen Schädigung und Variabilität werden in Tab. 12 und folgendem Abschnitt 3.4.3 erläutert, wo sie gleichzeitig zu den Ergebnissen an RTG-2-Zellen in Bezug gesetzt

werden. NQO wurde wegen seiner Wirksamkeit und seiner Verwendung als Positivkontrolle bei RTG-2-Zellen auch bei RTL-W1 häufiger als die anderen Substanzen eingesetzt. Zusätzlich zu den Versuchen in Abb. 24 sind daher weitere Untersuchungsergebnisse in Abbildung 25 und den Tabellen 10 und 11 dargestellt. Dies ermöglicht auch den Vergleich mit den entsprechenden Experimenten an RTG-2-Zellen, der im folgenden Abschnitt 3.4.3 gezogen wird.

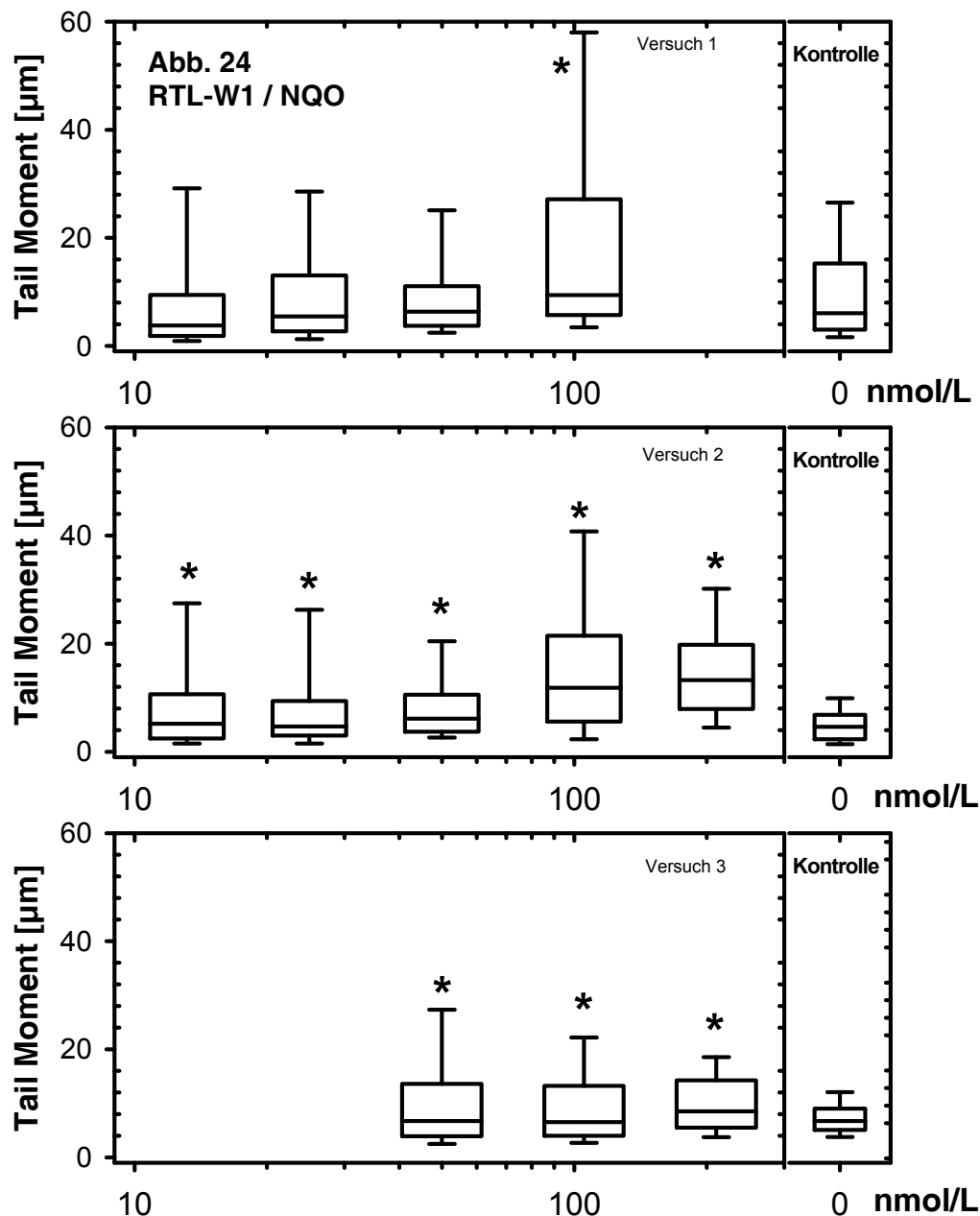


Abbildung 24: Gentoxizität (ausgedrückt als Tail Moment) von NQO (2 h Expositionszeit) im Comet Assay mit β NF-induzierten RTL-W1-Zellen. Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die gezeigten Kontrollen sind Negativkontrollen. 35 min Elektrophoresedauer.

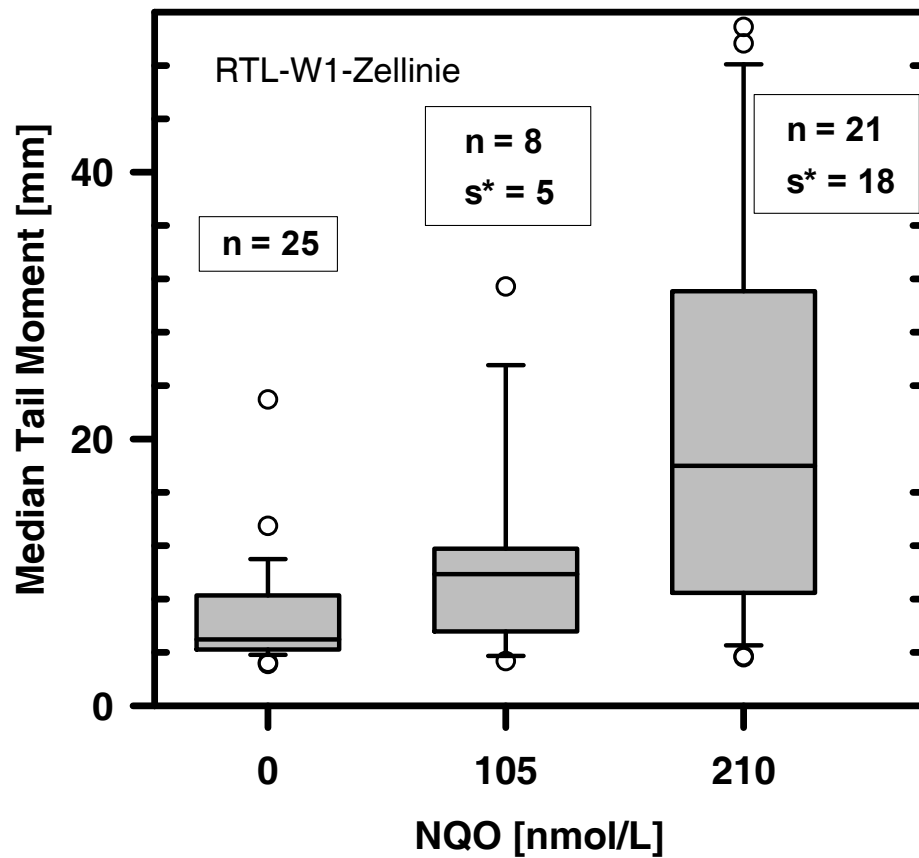


Abbildung 25: Ergebnisse des Comet Assay aus Versuchswiederholungen mit und ohne NQO an β NF-induzierten RTL-W1-Zellen. Die Boxplots stellen Verteilungen aus n Einzelversuchen dar. Die Konzentrationen von NQO sind jeweils angegeben, NegK = Negativkontrolle ohne NQO. s* kennzeichnet die Anzahl der Versuche, in denen die Erhöhung gegenüber der jeweiligen Negativkontrolle signifikant war. Vergleich zu Abb. 12 (gleicher Maßstab): Im Vergleich zu RTG-2-Zellen reagierten RTL-W1-Zellen schwächer auf NQO.

Tabelle 10: Versuchsübergreifender Vergleich und Vergleich von Stammlösungen für RTL-W1-Zellen + β NF, exponiert an NQO. Berechnungen der Tabelle entsprechend Tabelle 3.

Konzentration	Stammlsg.	Anzahl n	Mittelwert	Median	5 %Quantil	95 %Quantil
RTL-W1/Negativkontr.	-	25	6,74	4,98	3,34	12,98
RTL-W1/ 20 μ g/l NQO	Alle	8	11,16	9,88	3,81	24,56
RTL-W1/ 40 μ g/l NQO	Alle	21	22,11	17,99	3,71	49,65

Tabelle 11: Versuchsübergreifender Vergleich und Vergleich von Stammlösungen für RTL-W1-Zellen + β NF, exponiert an NQO. Berechnungen der Tabelle entsprechend Tabelle 4. Gleiche Versuche wie Tab. 10, jedoch ist hier dargestellt, wie stark der DNA-Schaden relativ zur jeweiligen Negativkontrolle zunahm.

Konzentration	Stammlsg.	Anzahl n	Mittelwert	Median	5 %Quantil	95 %Quantil
RTL-W1/Negativkontr.	-	25	1,00	1,00	1,00	1,00
RTL-W1/ 20 μ g/l NQO	Alle	8	2,68	1,50	0,94	7,40
RTL-W1/ 40 μ g/l NQO	Alle	21	4,33	2,76	0,75	10,24

Tabelle 12: Versuchsübergreifende Variabilität für zwei NQO-Konzentrationen und Negativkontrollen an RTL-W1-Zellen. Werte zu den Versuchen aus Tab. 10 ("alle Stammlösungen"). QK = "Quantilskoeffizient" zum Vergleich mit Tab. 6 = (Quantilsabstand der 15,87 %- bzw. 84,14 %-Quantile / (2*Median)); Variationskoeffizient = (Standardabweichung / Mittelwert). Vgl. Tab. 6 und dortige Erläuterungen.

Konzentration	n	QK	Variationskoeffizient
RTL-W1//Negativkontr.	25	55 %	64 %
RTL-W1/ 20 μ g/l NQO	8	35 %	79 %
RTL-W1/ 40 μ g/l NQO	21	90 %	68 %

3.4.3 Vergleich der drei Zellsysteme RTG-2, RTG-2 + S9 und RTL-W1+ β NF

3.4.3.1 NQO

Die Daten für die Exposition von RTG-2- und RTL-W1-Zellen an NQO und BaP wurden zum großen Teil schon in den vorangegangenen Abschnitten (3.4.2) für sich allein stehend präsentiert. Hier soll nun der Vergleich zwischen den verschiedenen Zellsystemen gezogen werden.

Gegenüber NQO reagierten β NF-induzierte RTL-W1-Zellen in anderer Weise als RTG-2. Die Nachweisgrenze lag zwar in einem ähnlichen Konzentrationsbereich, schwankte aber stärker (Abweichung nach oben; 13-105 nmol/l) (Tab. 13 u. Abb. 24).

Im Vergleich zu RTG-2-Zellen besaßen die Negativkontrollen bei RTL-W1 durchschnittlich höhere Werte. Die DNA-Schädigung der RTL-Zellen durch NQO-Behandlung war dagegen bei gleicher Dosis schwächer und stieg auch nicht so stark an, wie bei RTG-2-Zellen (die Unterschiede sind im Mann-Whitney-Rangsummentest je Konzentration signifikant). Die Steigung der Dosis-Wirkungskurve von RTG-2 war etwa um das 4-fache höher als die von RTL-W1+ β NF (Abb. 26, Abb. 12 gegenüber Abb. 25, Tab. 3 u. 10).

Die Variabilität war bei den RTL-W1-Zellen im Vergleich zu RTG-2-Zellen meist höher. Dies galt für Negativkontrollen und hohe NQO-Konzentrationen, allerdings nicht für die mittlere NQO-Konzentration, bei der die RTL-Zellen noch nicht stark auf NQO ansprachen (absolute Streuungsmaße: Tab. 10 u. Tab. 3; relative Streuungsmaße: Tab. 12 u. Tab. 6; siehe außerdem Abb. 25 gegenüber Abb. 12). Auch die LOEC-Werte schwankten von Versuch zu Versuch stärker als bei RTG-2-Zellen. Das Gesagte gilt für

die absoluten Größen der Variabilität. Im Verhältnis zu den Medianwerten war die Variabilität nur bei der Behandlung von RTG-2 mit 20 µg/l NQO und von RTL-W1 mit 40 µg/l NQO größer als bei den jeweiligen Kontrollen (ohne Abb.).

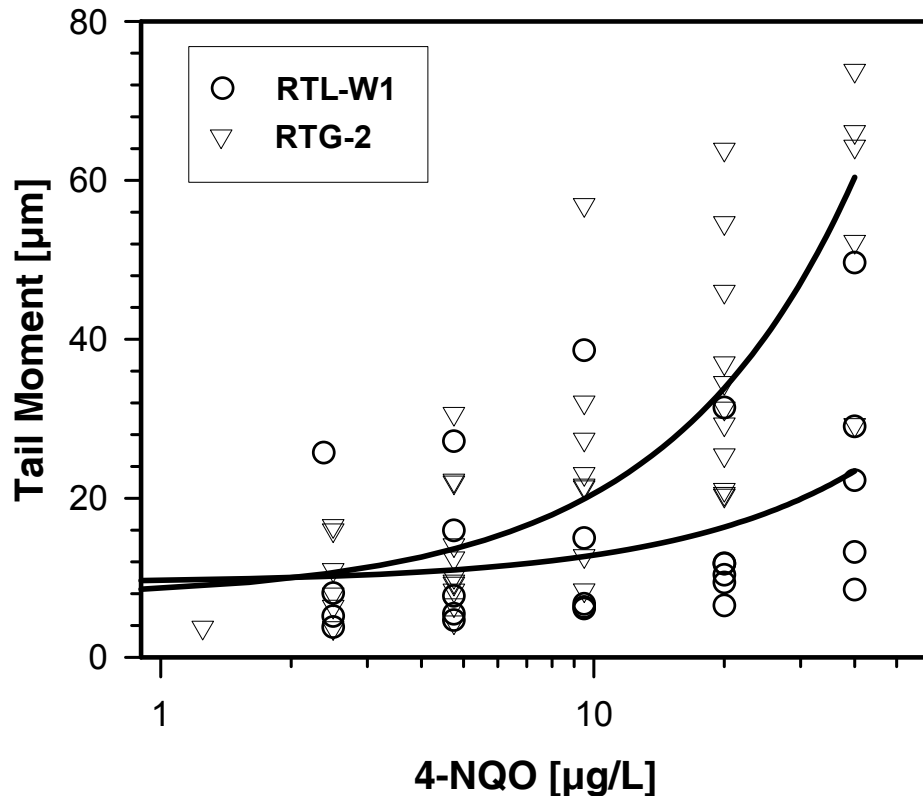


Abbildung 26: Dosis-Wirkungs-Kurven von NQO im Comet Assay: Vergleich der Zellsysteme RTG-2 und RTL-W1+βNF (2 h Expositionszeit, 35 min Elektrophorese). RTG-2-Zellen zeigen eine größere Steigung der Regressionsgeraden (welche hier wegen der logarithmischen Darstellung zu einer Kurve wird) als RTL-W1+βNF (siehe Text). Daten aus n = 11 Versuchen für RTG-2 - vgl. Abb. 9 bzw. Tab. 9 - und n = 6 Versuche für RTL-W1. Werte der linearen Regression ($y = mx + b$; wobei die Einheit von b in µm und m in µm/(µg/l) ist): Für RTG-2: $b = 7,3$ und $m = 1,33$; für RTL-W1: $b = 9,3$ und $m = 0,35$.

3.4.3.2 BaP

Das indirekt gentoxische BaP wurde mit drei unterschiedlichen Systemen getestet, daher lassen sich drei Vergleiche ziehen:

a) RTG-2 versus RTL-W1:

Der Vergleich von RTG-2-Zellen mit β-Naphthoflavon- (βNF) induzierten RTL-W1-Zellen für BaP ergab eine leicht höhere Sensitivität und Steigung der Dosis-Wirkungskurve von RTL-W1+βNF als von RTG-2 (Tab. 13; Abb. 27).

b) RTG-2 versus RTG-2 plus S9:

Eine externe metabolische Aktivierung von RTG-2-Zellen mit S9-Überstand aus Rattenleberhomogenat hatte eine leichte Erhöhung der BaP-Sensitivität und der Reaktion über den gesamten getesteten Dosisbereich zur Folge, sodass hier die Steigung der Dosis-Wirkungskurve durch S9-Zusatz erhöht wurde (Abb. 28).

c) RTL-W1 versus RTG-2 plus S9

βNF-induzierte RTL-W1-Zellen und S9-supplementierte RTG-2-Zellen reagierten beide etwas stärker auf BaP als nicht-supplementierte RTG-2-Zellen. Eindeutige Unterschiede zwischen diesen beiden Systemen waren bei der gegebenen geringen Datenbasis nicht sicher zu erkennen. Im Gegensatz zu RTL versus RTG ohne S9 wurden hier auch keine Parallelversuche - also gleiche Elektrophoreseläufe - gemacht, die einen höheren Wert für Vergleiche besitzen (s. Diskussion, 4.1.5).

Da sowohl bei externer metabolischer Aktivierung, als auch bei den RTL-W1-Zellen, die eine interne Metabolisierungskapazität besitzen (siehe 4.3.1.2), eine höhere Sensitivität für BaP zu erwarten ist, erschienen die Ergebnisse plausibel. Bemerkenswert war, dass sämtliche Konzentrationen weit über der Wasserlöslichkeitsgrenze von BaP ($1,6 \mu\text{g/l}$) lagen (Yalkowsky & Dannenfelser 1990). Auch in anderen Arbeiten sind häufiger solche Konzentrationen für BaP anzutreffen (s. Diskussion).

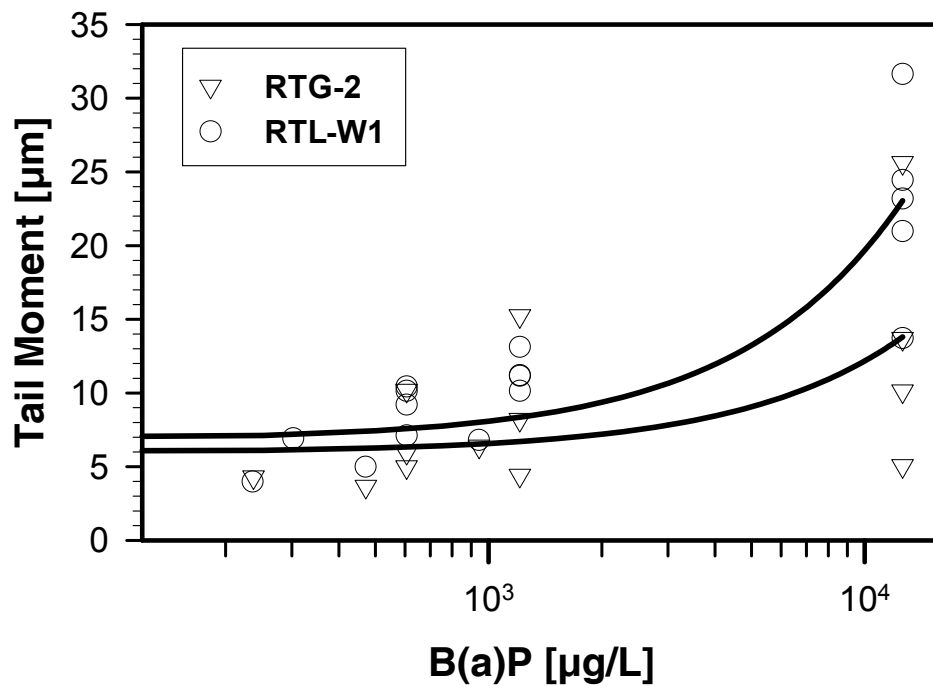


Abbildung 27: Dosis-Wirkungs-Kurven von BaP im Comet Assay: Vergleich der Zellsysteme RTG-2 und RTL-W1+ β NF (2 h Expositionszeit, 35 min Elektrophorese). RTG-2-Zellen zeigen hier eine etwas geringere Steigung der Regressionsgeraden (welche hier wegen der logarithmischen Darstellung zu einer Kurve wird) als RTL-W1+ β NF. $n = 4$ Versuche für RTG-2 und $n = 5$ Versuche für RTL-W1. Werte der linearen Regression ($y = mx + b$; wobei die Einheit von b in μm und m in $\mu\text{m}/(\mu\text{g/l})$ ist): Für RTG-2: $b = 6,0$ und $m = 0,62 \times 10^{-3}$; für RTL-W1: $b = 6,8$ und $m = 1,29 \times 10^{-3}$.

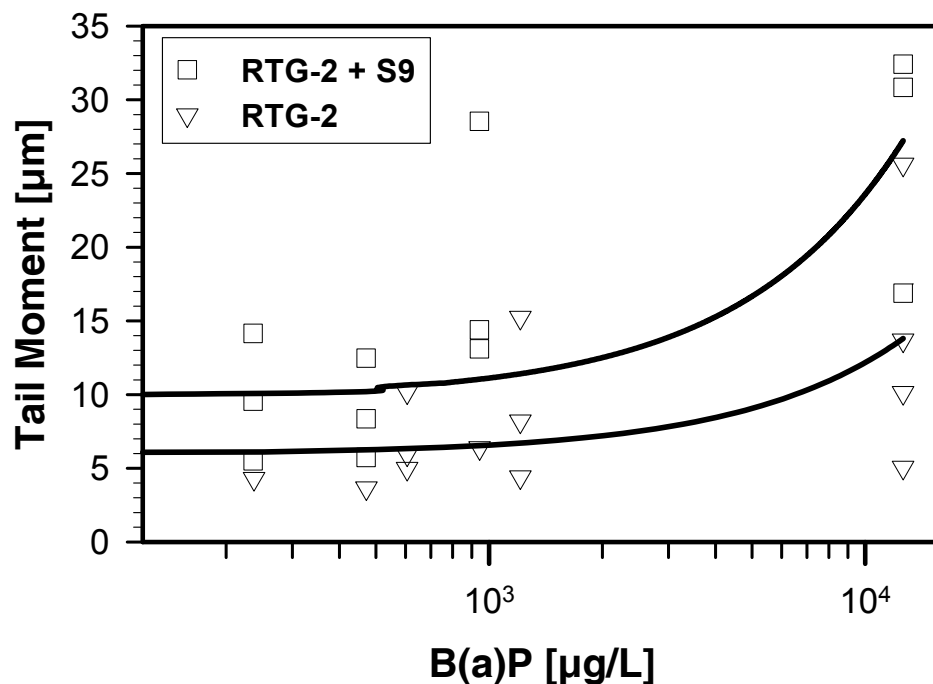


Abbildung 28: Dosis-Wirkungs-Kurven von BaP im Comet Assay: Vergleich der Zellsysteme RTG-2 und RTG-2 + S9 (2 h Expositionszeit, 35 min Elektrophorese). S9-supplementierte RTG-2-Zellen zeigen hier eine etwas erhöhte Steigung der Regressionsgeraden als nicht supplementierte RTG-2. n = 4 Versuche für RTG-2 und n = 3 Versuche für RTG-2 + S9. Eine erhöhte Schädigung der Negativkontrollen bei S9-Zusatz lag nicht vor, dieser Eindruck entsteht hier durch die lineare Regression, die nur als Vereinfachung des tatsächlichen Kurvenverlaufs gewählt wurde. Die lineare Regression wird außerdem in der Abbildung wegen der logarithmischen Darstellung zu einer Kurve. Werte der linearen Regression ($y = mx + b$; wobei die Einheit von b in μm und m in $\mu\text{m}/(\mu\text{g/l})$ ist): Für RTG-2: $b = 6,0$ und $m = 0,62 \times 10^{-3}$; für RTG-2 + S9: $b = 9,7$ und $m = 1,39 \times 10^{-3}$.

3.4.4 Zusammenfassung der Einzelsubstanzergebnisse

Die Substanzen AAF und DMNA riefen bei RTG-2-Zellen keine nachweisbare gentoxische Reaktion über einen weiten Konzentrationsbereich hervor (Ausnahme: bei DMNA gab es einen Einzelversuch, bei dem die höchste Konzentration leicht ansprach). NF erzeugte eine gentoxische Antwort, jedoch erst in relativ hohen Konzentrationsbereichen ab $130 \mu\text{mol/l}$. Für BaP lag die Sensitivität im Bereich von $2\text{-}5 \mu\text{mol/l}$. Hochsensitiv war der Comet Assay mit RTG-2-Zellen gegenüber den Substanzen MNNG und NQO; dort lagen die Nachweisgrenzen im Bereich von $70\text{-}140 \text{ nmol/l}$ ($10\text{-}20 \mu\text{g/l}$; MNNG) bzw. 25 nmol/l ($4,75 \mu\text{g/l}$; NQO). Dies waren die Ergebnisse von drei Versuchswiederholungen (Tab. 13), weitere Versuchswiederholungen ergaben für RTG/NQO einen LOEC zwischen $2,5\text{-}4,75 \mu\text{g/l}$ (Tab. 9).

Für RTL-W1-Zellen (Rainbow Trout Liver) wurden anhand der Substanzen BaP und NQO ähnliche Nachweisgrenzen wie für die RTG-2-Zellen festgestellt – die LOECs lagen dabei für BaP tendenziell niedriger, für NQO tendenziell höher. Die NQO-Dosis-Wirkungskurve verlief eindeutig flacher als bei RTG-2. Durch externe metabolische

Aktivierung des RTG-2-Systems mit Rattenleber-S9 wurde die Sensitivität gegenüber BaP tendenziell erhöht. Als Fazit lässt sich feststellen, dass zwischen den Systemen Unterschiede bestehen, die zwar zum Teil eindeutig und signifikant sind, aber keine Unterschiede um Größenordnungen darstellen.

Tabelle 13 (Teil1): Ansprechbarkeit und Sensitivitäten der Einzelsubstanzen im Comet Assay mit den Fischzelllinien

Zellsystem	Substanz (Molmasse)	Wasserlöslichkeit der Testsubstanz µg/l	getesteter Konzentrationsbereich	
			µg/l	⇒ µmol/l
RTG-2	AAF (223,3)	5300	0,6 – 6000	0,0027 - 26,8697
RTG-2	BaP (252,3)	1,6	236 – 12618	0,9354 - 50,0119
RTG-2	DMNA (74,08)	∞	14,3 – 10 ⁷	0,1930 - 134989,2009
RTG-2	NF (238,18)	95000	3,125*10 ⁴ - 2,5*10 ⁵	131,2033 - 1049,6263
RTG-2	NQO (190,17)	10 ⁶ -10 ⁷	2,5 - 40	0,0131 - 0,2103
RTG-2	MNNG (147,09)	< 5*10 ⁶	5 - 160	0,0340 - 1,0878
RTL-W1 +βNF	BaP	1,6	236-63070	0,9354 - 249,9802
RTL-W1 +βNF	NQO	10 ⁶ -10 ⁷	2,5-40	0,0131 - 0,2103
RTG-2 + S9	BaP	1,6	236 – 12618	0,9354 - 50,0119
20 min Elpho RTG-2	NQO	10 ⁶ -10 ⁷	1,25 – 80	0,0066 - 0,4207

Tabelle 13 (Fortsetzung, Teil2): Ansprechbarkeit und Sensitivitäten der Einzelsubstanzen im Comet Assay mit den Fischzelllinien

Zellsystem	Nachweisgrenzen (LOECs) aus n = 3 Versuchen		Niedrigste getestete nichteffektive Konzentrationen (NOECs) aus n = 3 Versuchen µg/l
	µg/l	⇒ µmol/l	
RTG-2	n.n.	n.n.	3000
	n.n.	n.n.	5000
	n.n.	n.n.	6000
RTG-2	605,5	2,3999	0
	1211	4,7998	605,5
	943	3,7376	471
RTG-2	1,14*10 ⁶	15388,7689	14300
	n.n.	n.n.	10 ⁶
	n.n.	n.n.	10 ⁷
RTG-2	3,125*10 ⁴	131,2033	0
	6,25*10 ⁴	262,4066	3,125*10 ⁴
	3,125*10 ⁴	131,2033	1,5625*10 ⁴
RTG-2	4,75	0,0250	0
	4,75	0,0250	0
	4,75	0,0250	2,5
RTG-2	20	0,1360	10
	10	0,0680	0
	20	0,1360	10
RTL-W1 +βNF	605,5	2,3999	0
	605,5	2,3999	0
	471	1,8668	236
RTL-W1 +βNF	20	0,1052	9,5
	2,5	0,0131	0
	9,5	0,0500	0
RTG-2 + S9	471	1,8668	236
	236	0,9354	0
	943	3,7376	471
20 min Elpho RTG-2	5	0,0263	2,5
	5	0,0263	2,5
	5	0,0263	2,5

3.5 Umweltproben

3.5.1 Native Oberflächenwasser und Zusatzproben im Rahmen eines Gentoxizitätstest-Projektes

3.5.1.1 Das Testprogramm und seine Ziele

Eine Extraktion und Anreicherung von Umweltproben vor der Testung verändert immer den ursprünglichen Zustand der Proben. Dies kann zu einer Verschlechterung der Aussagefähigkeit über die tatsächliche Relevanz der Testergebnisse führen. Daher werden gegenwärtig ökotoxikologische Testmethoden gesucht, die für *native* (unbehandelte) Wasserproben geeignet sind, besonders im Hinblick auf ihre Sensitivität. Auch kann der Aufwand für die Testung vermindert werden, wenn die Proben nicht vorher aufbereitet werden müssen. Daher wurden im Rahmen des BMBF-Projekts

"Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" (1995-1998) native Oberflächenwasserproben aus Rhein und Elbe mit dem Comet Assay auf gentoxische Wirkung geprüft. Die Proben wurden über den Zeitraum eines Jahres von jeweils drei Probenahmestellen an den beiden Flüssen und dem Wahnbachtal-Stausee entnommen (s. 2.7.2 und Abb. 4.). Der Wahnbachtal-Stausee ist ein potenzielles Trinkwasserreservoir, sodass diese Wasserproben eine natürliche Referenz - neben den Negativkontrollen, welche mit technisch deionisiertem Wasser angesetzt wurden, darstellten.

Die Untersuchungen hatten die folgenden Ziele:

- Das Testsystem "Comet Assay mit Fischzelllinien" sollte für eine routinemäßige Anwendung an komplexen Umweltgemischen erprobt, angepasst und optimiert werden;
- Die methodische Durchführbarkeit des Tests an Umweltproben sollte geprüft werden (Praktikabilität, Identifizierung von Problemen);
- Im Rahmen des Gentoxizitätsprojektes sollten Grundlagen zur Entwicklung einer gentoxikologischen Testbatterie geschaffen werden;
- Die Eignung des Assay zur Detektion gentoxischer Wirkungen in nativen Wasserproben sollte bestimmt werden, z. B. hinsichtlich seiner Sensitivität;
- Methoden und Ergebnisse verschiedener anderer Gentoxizitätstests sollten mit denen des Comet Assay verglichen werden. Im Rahmen des Gentoxizitätsprojektes sollte solch ein Vergleich durch die Testung derselben Wasserproben in unterschiedlichen Arbeitsgruppen ermöglicht werden.;
- Es war zu klären, ob und wie weit sich die Antwort im Comet Assay mit der Anwesenheit bestimmter chemischer Stoffe in den Wasserproben korrelieren lässt. Eine Auswahl gentoxischer Verbindungen wurde projektbegleitend mittels chemischer Analyse detektiert;
- Hinweise auf zellsystem-spezifische Besonderheiten sollten gefunden werden; Beispiel einer Frage: Verhalten sich RTG-2- und RTL-W1-Zellen auch im Umwelttest unterschiedlich - wie auch schon im Monosubstanztest? (Der RTG/RTL-Zellvergleich wurde anhand einer Probe vom Gelände des Gaswerks Düsseldorf durchgeführt).
- Obwohl die Untersuchungen nur als Vorlauf für standardisierte Routinemessprogramme anzusehen sind, sollte die Abhängigkeit der gentoxischen Potenziale vom Flussverlauf und vom jahreszeitlichen Verlauf untersucht werden. Vergleiche der gentoxischen Belastung von Rhein, Elbe und der "Referenzprobe" von der Wahnbachtalsperre boten sich an.

In das Testprogramm wurden weitere Zusatzproben, z. B. aus Schmilka, aus der Wupper und von dem stark mit BTEXen ("Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol") kontaminierten Standort Gaswerksgelände Düsseldorf einbezogen, die mit übereinstimmender Methodik (1:2-Verdünnung der nativen Proben) untersucht wurden. So sollten zusätzlich zu den mutmaßlich eher gering kontaminierten Proben solche untersucht werden, für die (gen-)toxische Wirkungen erwartet wurden. Darüber hinaus gehörten einige weitere Proben zum Testprogramm, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen wird.

3.5.1.2 Testbewertung nach unterschiedlichen Verfahren

Jede Wasserprobe wurde – wie im Methodenteil unter 2.9 beschrieben – drei Mal getestet und einem dreistufigen biometrischen Bewertungsverfahren (Probe positiv/negativ) unterzogen, in dem sowohl die statistische Signifikanz des Einzeltests als auch die versuchsübergreifende Signifikanz getestet wurden, und außerdem mindestens zwei von drei Einzelversuchen positiv bewertet sein mussten, bevor eine Probe als gentoxisch eingestuft wurde. Obwohl als "standardisiertes Verfahren" nur die Gesamtbewertung nach diesem Schema als gültig angesehen werden kann, werden hier auch die Einzeltestergebnisse dargestellt. Die Einzeltestergebnisse besitzen durch ihr kontinuierliches und quantifizierbares Reaktionsspektrum einen weitergehenden Informationsgehalt und außerdem können die Versuche so mit den anderen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verglichen und diskutiert werden.

3.5.1.3 Ansprechbarkeit: Häufigkeit und Stärke positiver Testergebnisse, Sensitivität des Testsystems

Insgesamt wurden 49 Wasserproben getestet, die von den verschiedenen Probenahmeorten und verschiedenen Probenahmeterminen stammten. Der Comet Assay mit RTG-2-Zellen erwies sich als ansprechbar: Nach dem dreistufigen biometrischen Bewertungsverfahren wurden 15 Proben (30,6 %) davon als positiv gentoxisch eingestuft.

Jede Wasserprobe wurde drei Mal getestet, sodass 147 Einzelversuche (EV) vorlagen. In 52 von diesen 147 Einzelversuchen trat eine positive gentoxische Wirkung in den Wasserproben auf. Nach diesem Bewertungsverfahren wurden also 35,4 % der Versuche als positiv gentoxisch bewertet, während es mit dem Gesamtbewertungsverfahren nur 30,6 % waren. Es ließ sich also empirisch ein Einfluss des "strengen" Zusatzkriteriums, dass zwei von drei Versuchen positiv sein mussten, feststellen. In beiden Fällen erstaunt der Anteil von ca. einem Drittel positiver Wasserproben.

Bei Betrachtung der als positiv gentoxisch bewerteten Fälle zeigte sich, dass die Absolutunterschiede zur Negativkontrolle meist nur gering waren. Im Mittel erreichten die positiven Einzeltests etwa das 2,5-fache der jeweiligen Negativkontrolle. Bei einem Vergleich mit NQO-Versuchen würde dies etwa den Effekten bei NQO-Konzentrationen von 8,3 µg/l entsprechen (Zugrundelegen der Regressionsgeraden in Abb. 9a, $y = 1,33x + 7,32$). Nur 10 % der positiven Einzeltests (das 90 %-Quantil) lagen über dem 4,8-fachen der Negativkontrolle (dies entspräche 20,9 µg/l NQO). Die mittlere Differenz der Tail Moments zur Negativkontrolle lag bei 6,56 µm, das 90 %-Quantil bei 16,6 µm (= µm: hier keine Längeneinheit).

In den Tabellen 14 und 15 sind die Ergebnisse der Wassertestung mit RTG-2-Zellen zusammengefasst. Die gesamten Einzeltestergebnisse sind im Anhang 1 aufgeführt. Im Anhang 2 finden sich exemplarisch und zum Vergleich mit den Monosubstanzergebnissen die Boxplots für Einzelversuche der Rhein-Proben eines Probenahmetermins. Die gesamten Wasserproben-Einzelversuche sind im Abschlussbericht zum Verbundvorhaben dargestellt (Nehls & Segner 1999)

Tabelle 14: Häufigkeit und Stärke positiver Testergebnisse der Wasserproben aus dem BMBF-Projekt "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" 1995-1998 im Comet Assay mit RTG-2-Zellen. Die Ergebnisse sind hier nach Probenahmeorten bzw. Kontrollversuchen zusammengefasst; der zeitliche Aspekt ist hier nicht dargestellt. TM = Medianwert des Tail Moment. Gesamtwertung: dreistufiges Verfahren wie im Methodenteil beschrieben, Einzeltests: einstufiges Verfahren. Probenahmeterminen und Einzelergebnisse finden sich im Anhang 1. Um ein weiteres, anschauliches Kriterium zum Vergleich zu zeigen, das sich von den anderen Kriterien unterscheidet, werden hier mehr oder weniger willkürlich zwei Werte, die das Tail Moment annehmen bzw. überschreiten konnte, gezeigt. Aus dem Vergleich mit den NQO-Monosubstanzversuchen, z. B. Tab. 3, kann man sehen, dass 10 µm oft bei geringer, aber doch recht eindeutiger Schädigung erreicht werden, während bei 20 µm schon eine deutliche Schädigung (z. B. entsprechend einer Behandlung mit durchschnittlich mehr als 20 µg/l NQO) vorliegt.

	Anz. positive Proben Gesamtwertung / Anzahl Proben	Anzahl positiver Einzeltests / Anzahl Einzeltests (n)	Anteil positiver Einzeltests	Anzahl Einzeltests mit TM > 10	Anzahl Einzeltests mit TM > 20
PosK	17 / 17	51 / 51	100,00 %	42	29
NegK	0 / 17	0 / 51	0,00 %	1	0
Wasserproben gesamt	15 / 49	52 / 147	35,37 %	20	10
Schmil	1 / 6	4 / 18	27,78 %	1	0
Dess	2 / 5	7 / 15	46,67 %	1	0
Schnack	1 / 6	6 / 18	33,33 %	2	1
Karls	2 / 6	7 / 18	38,89 %	3	3
Köln	3 / 6	8 / 18	44,44 %	5	3
Düss	4 / 6	9 / 18	61,11 %	6	3
Wahn	1 / 6	4 / 18	22,22 %	0	0
GW Düss	1 / 2	3 / 6	50,00 %	0	0
Wupp	0 / 2	1 / 6	16,67 %	1	0
Schmilka Zus.	1 / 2	3 / 6	50,00 %	1	0
Wundr A	0 / 1	0 / 3	0,00 %	0	0
Wundr B	0 / 1	0 / 3	0,00 %	0	0

Tabelle 15: Statistische Kenngrößen zu den Versuchen des Probenprogramms im BMBF-Projekt "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" (1995-1998) beim Comet Assay mit RTG-2-Zellen, bezogen auf Einzelversuche (Tail-Moment-Medianwerte aus 100 Comets). Die Proben sind nach Probenahmestellen, Kontrollen usw., aber nicht zeitlich gruppiert (Probenahmetermine siehe Anhang 1).

	Anzahl n	Arithmet. Mittel	Median	Minimum	Maximum	25 %Quantil	75 %Quantil
Alle Proben	249	10,03	5,38	1,17	66,49	3,63	10,27
PosK	51	24,90	22,88	4,56	66,49	11,40	31,97
NegK	51	4,47	3,82	1,55	10,89	2,94	5,47
Wasserproben gesamt	147	6,79	4,80	1,17	33,41	3,44	7,44
Schmil	18	4,97	4,33	2,19	11,24	2,95	5,74
Dess	15	4,95	4,25	2,20	10,53	2,95	6,18
Schnack	18	5,96	4,57	2,29	22,67	3,40	6,11
Karls	18	9,12	5,71	3,34	33,41	4,23	8,28
Köln	18	8,97	5,75	3,09	24,91	4,44	9,95
Düss	18	9,94	5,95	3,12	31,64	4,03	11,05
Wahn b	18	4,83	4,65	2,75	9,29	3,13	5,58
GW Düss	6	4,56	4,44	2,02	8,15	3,28	5,15
Wupp	6	5,34	4,32	2,70	10,30	3,09	6,88
Schmilka Zusatz	6	10,63	8,67	6,88	19,40	7,07	12,39
Wundr A	3	2,17	2,29	1,17	3,06	1,73	2,67
Wundr B	3	2,04	2,27	1,44	2,42	1,85	2,35

3.5.1.4 Unterschiedliches gentoxisches Potenzial verschiedener Probenahmeorte

Vor allem die Rhein-Proben aus Düsseldorf, Köln und Karlsruhe zeigten häufigere und höhere gentoxische Wirkungen als die übrigen Proben: So traten bei den Rhein-Proben 9 positive Proben von 18 (50 %) gegenüber 4 Positiven von 17 (24 %) bei der Elbe auf. Wurden die Einzelversuche in Betracht gezogen, so waren 24 von 54 EV (44 %) mit Rhein-Proben positiv gegenüber 17 von 51 (33 %) Elbe-Proben. Die Proben von der Wahnachtalsperre zeigten generell die geringste Gentoxizität. Je nachdem, ob das "biometrische Gesamtbewertungsverfahren", Einzel-Signifikanztests oder die absolute Stärke der DNA-Schädigung (Größe des Tail Moments) als Beurteilungsgrundlage dienten, ließen sich Rangfolgen des gentoxischen Potenzials aufstellen, die sich in ihrer Aussage im vorliegenden Fall nur leicht voneinander unterschieden. Unterschiede durch verschiedene Bewertungsverfahren ergaben sich dann nur für die Elbe-Proben (s. Tab. 16-18): hier konnte jede der drei Probenahmestellen "an der Spitze" liegen – In jedem Fall blieben Düsseldorf, Köln und Karlsruhe die am stärksten belasteten Probenahmeorte

im Comet Assay mit RTG-2-Zellen. Mit anderen Worten ist dieses Ergebnis also relativ robust und eindeutig, denn es ist unabhängig von der Wahl des Auswertungsverfahrens.

Tabelle 16: Rangfolge des gentoxischen Potenzials der Oberflächenwasser aus dem BMBF-Projekt nach Häufigkeit positiver Gesamtergebnisse gemäß dreistufigem Bewertungsverfahren wie im Methodenteil beschrieben. Pfeil: zunehmender Effekt; *: Dessau kann wegen der abweichenden Anzahl von Versuchen nicht eindeutig in die Rangfolge eingeordnet werden.


	<i>Anzahl Proben</i>	<i>Biometrische Gesamtbewertung positiv</i>		<i>Effektstärke</i>
		<i>Anzahl</i>	<i>Anteil</i>	
NegK	17	0	0 %	
Wahnab	6	1	16,7 %	
Schnack	6	1	16,7 %	
Dess *	5 *	2 *	40 % *	
Schmil	6	1	33 %	
Karlsru	6	2	33 %	
Köln	6	3	50 %	
Düss	6	4	83 %	
PosK	17	17	100 %	

Tabelle 17: Rangfolge des gentoxischen Potenzials der Oberflächenwasser aus dem BMBF-Projekt nach Häufigkeit positiver Einzeltests (Erste Stufe des Bewertungsverfahrens, siehe Methodenteil). Pfeil: zunehmender Effekt; *: Dessau kann wegen der abweichenden Anzahl von Versuchen nicht eindeutig in die Rangfolge eingeordnet werden.



	<i>Anzahl Einzeltests (n)</i>	<i>Positive Einzeltests</i>		<i>Effektstärke</i>
		<i>Anzahl</i>	<i>Anteil</i>	
NegK	51	0	0 %	
Wahnab	18	4	22 %	
Schmil	18	4	22 %	
Schnack	18	6	33 %	
Dess *	15 *	7 *	46 % *	
Karlsru	18	7	38 %	
Köln	18	8	44 %	
Düss	18	9	50 %	
PosK	51	51	100 %	

Tabelle 18: Rangfolge des gentoxischen Potenzials nach Häufigkeit hoher Absolutwerte des Tail-Moment-Medians im Einzeltest. Pfeil: zunehmender Effekt

	Anzahl Einzel- tests (n)	Einzeltests mit TM > 10		Anzahl Einzel- tests mit TM > 20	Effektstärke
		Anzahl	Anteil		
Wahnb	18	0	0 %	0	
NegK	51	1	1,9 %	0	
Schmil	18	1	5,6 %	0	
Dess *	15 *	1 *	6,6 % *	0 *	
Schnack	18	2	11,1 %	1	
Karlsr	18	3	16,6 %	3	
Köln	18	5	27,8 %	3	
Düsseldf	18	6	33 %	3	
PosK	51	42	82 %	29	

3.5.1.5 Chemisch analysierte Inhaltsstoffe der Proben im Hinblick auf gentoxische Wirkungen

Die Wasserprobenuntersuchungen im Rahmen des Gentoxizitätsprojektes beinhalteten neben den Gentoxizitätstests chemische Analysen. Diese Analysen wurden nicht im Rahmen der vorliegenden Dissertation von mir gemessen, sondern von verschiedenen Analyselabors bereitgestellt (GEW Gas- Elektrizitäts- u. Wasserwerke Köln, Abt. Wassergewinnung/labor; Rheingütemessstation Maxau b. Karlsruhe; ARW Rheinwasserwerte Standort Düsseldorf Flehe; Wahnachtalsperrenverband Siegburg, Chemisches Labor; ALGE GmbH Gelsenkirchen; Elbe, TZW Technologiezentrum Wasser; Messstelle Schmilka und Messstelle Schnackenburg; STAU Dessau/Wittenberg Abt. Umweltlabor; Sacher et al. 2000). Dabei wurden alle hier getesteten Proben auf das Vorhandensein von 41 aromatischen Stickstoffverbindungen, für die in der Literatur Gentoxizität bereits beschrieben wurde, untersucht. Analysedaten zu zusätzlichen Parametern lagen vor, jedoch gab es hier in einigen Fällen von Probenahmeort zu Probenahmeort Unterschiede im Spektrum der analysierten Substanzen bzw. einige Daten wurden an anderen Proben aus projektexternen Routinemessungen gewonnen. Es lagen also zum Teil Daten für nichtidentische Proben vor, die zwar von den gleichen Probenahmestellen stammten, aber zu anderer Zeit genommen wurden.

Nachdem Rangfolgen der Gentoxizität aufgestellt wurden und mehr oder weniger positive Testergebnisse den negativen gegenübergestellt werden konnten (s. 3.5.1.3 u. 3.5.1.4), stellte sich die Frage nach Korrelationen dieser Ergebnisse aus dem Comet Assay mit dem Auftreten bestimmter Substanzen oder Substanzmengen.

Als Hauptergebnis ist festzuhalten, dass in den Proben Korrelationen zwischen deren einzelnen spezifischen Kontaminanten und deren Gentoxizität nicht gefunden werden konnten. Es blieb nun nur die Suche nach anderen Anhaltspunkten, z. B. unspezifischeren Analyseparametern, die mit der Gentoxizität möglicherweise korrelierten:

Die generell geringe Gentoxizität der Proben von der Wahnbachtalsperre ging einher mit ebenso generell geringer bzw. nicht vorhandener Kontamination in diesen Proben. Das zeigte sich sowohl bei der Einzelstoffanalyse als auch bei den organischen Summenparametern (DOC, AOX und AOS, s. Tab. 19). Auch die elektrische Leitfähigkeit dieser Proben war geringer als die der Übrigen und schließlich war schon mit bloßem Auge eine geringere Trübung dieser Proben zu erkennen.

Die Proben aus Rhein und Elbe waren dagegen sichtbar trüber (besonders die Rhein-Proben) und zeigten höhere Werte für die elektrische Leitfähigkeit und organische Summenparameter (Tab. 19). In ihnen wurde eine breite Palette an Stoffen gefunden, darunter Substanzen, die als gentoxisch angesehen werden, wie Nitroaromaten, Schwermetalle und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Auch Pestizide wurden dort festgestellt (wobei diese nicht oder nicht unbedingt eine gentoxische Rolle spielen müssen).

Tabelle 19: Elektrische Leitfähigkeit und organische Summenparameter für die Proben von Rhein, Elbe und der Wahnbachtalsperre. Mittelwerte \pm Standardabweichungen. DOC = dissolved organic carbon, gelöster organischer Kohlenstoff; AOX = adsorbierbare organische Halogenverbindungen; AOS = adsorbierbare organische Schwefelverbindungen (Quelle: Dr. T. Grummt, UBA, Bad Elster)

	Wahnb	Schmil	Dess	Schnack
Leitfähigkeit (mS/m)	31,08 \pm 18,58	49,18 \pm 6,10	63,98 \pm 5,98	100,68 \pm 34,64
DOC (mg/l)	1,45 \pm 0,08	5,37 \pm 11,98	4,36 \pm 0,34	5,02 \pm 0,28
AOX (μg/l Cl)	5,20 \pm 0,45	39,50 \pm 0,50	17,20 \pm 2,28	24,20 \pm 4,97
AOS (μg/l S)	31,00 \pm 7,07	181,67 \pm 22,29	147,40 \pm 32,31	170,00 \pm 23,45
		Karls	Köln	Düss
Leitfähigkeit (mS/m)		50,35 \pm 16,65	75,20 \pm 17,62	66,77 \pm 10,30
DOC (mg/l)		2,27 \pm 0,41	3,00 \pm 0,71	2,93 \pm 0,68
AOX (μg/l Cl)		10,83 \pm 2,93	14,33 \pm 2,16	15,50 \pm 2,26
AOS (μg/l S)		54,60 \pm 10,16	77,20 \pm 15,02	86,60 \pm 10,24

Da es den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen würde und auch bezüglich der Interpretation nicht sinnvoll erscheint, die Analyseergebnisse im Einzelnen aufzulisten, werden im Folgenden die Flussproben nur kurz und zusammenfassend bezüglich ihrer Inhaltsstoffe charakterisiert (zusammengetragen aus den Daten der oben genannten Analyselabors):

Schmilka:

In allen Schmilka-Proben waren 2,4-Dinitrotoluol und Nitrobenzol nachweisbar, ebenso die Schwermetalle Zn, Ni, Pb und U. Weitere Kontaminationen, die nicht durchgängig auftraten, waren 2-Nitrotoluol, 2-Amino-4-Nitrotoluol, 2,4-Dichlorphenol, 2-Chlorphenol, Azobenzol, p-Chloranilin, p-Anisidin, p-Cresidin, o-Toluidin, o-Anisidin, Fluoranthren und weitere PAHs, außerdem Hg, Cr und Cu.

Pestizide: HCB, γ -HCH (=Lindan), verschiedene PCBs, Desethylatrazin, Atrazin, Hexazinon.

Dessau:

Auch hier waren in allen Proben die Schwermetalle Zn, Ni, Cu, Pb, Cd nachweisbar, in einigen Proben auch Hg. Ebenfalls in allen Proben fanden sich Pentachlorphenol, p-Chloranilin und Fluoranthen (Fl.: im Nanogramm/L-Bereich), häufig kam auch o-Toluidin vor.

Pestizide: : α -, β -, γ -, und δ -HCH, Aldrin, Isodrin, Dieldrin, Endrin. o,p'- und p,p'-DDD, o,p'- und p,p'-DDE, o,p'- und p,p'-DDT, verschiedene PCBs.

Schnackenburg:

Hier kamen durchgängig Zn, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb und Hg vor. Häufig (aber nicht immer) waren 2,4-Dinitrotoluol und Nitrobenzol nachweisbar, außerdem kamen o-Toluidin, 2-Amino-4-Nitrotoluol, 2-Nitrotoluol, m-Cresidin, p-Chloranilin, p-Cresidin vor.

Pestizide: α -, β -, γ -, und δ -HCH, p,p'- und o,p'-DDT, o,p'-DDD, p,p'-DDE, Simazin, Atrazin, Desethylatrazin, Ametryn, Prometryn;

Karlsruhe:

In einigen Karlsruher Proben wurde o-Toluidin gefunden, in einer weiteren Probe auch m-Cresidin. Die Schwermetalle Zn, Ni, Cr und Cu waren häufig in den Proben nachweisbar. Die Analysen nichtidentischer Proben ergaben auch das Vorkommen von 2-Chlornitrobenzol, 4-Chlornitrobenzol, 4-Nitrotoluol und Fluoranthen. Pestizide: Atrazin, Desethylatrazin, Aziprotryn, Diazinon, Diuron, Hexazinon, Metolachlor, Propazin, Simazin, Terbutylazin.

Köln:

In den Proben aus Köln fand sich stets o-Toluidin und häufig o-Anisidin, zum Teil auch m-Cresidin. Die weiteren vorliegenden Analysedaten waren nicht so detailliert wie bei den übrigen Proben, sodass hierüber keine genaueren Angaben gemacht werden können.

Düsseldorf:

In den Düsseldorfer Proben war stets o-Toluidin nachweisbar, auch o-Anisidin kam häufig vor. Weitere z.T. vorkommende Nitroaromaten waren m-Cresidin und 2-Amino-4-Nitrotoluol. Weitere Analysedaten lagen nur zum Teil für identische Proben vor. In diesen und weiteren Proben von der Probenahmestelle kamen z.T. Cd, Ni und Cr vor. Für die Probenahmestelle Düsseldorf wurden auch Analysen auf Arzneimittelwirkstoffe durchgeführt. Es wurden dabei z. B. Diclofenac, Carbamazepin und weitere gefunden. Pestizide: Bentazon, Metolachlor, Chloridazon, Isoproturon.

Fazit:

Vor allem bei der Gegenüberstellung der Proben von der Wahnachtalsperre mit den Proben aus Rhein und Elbe kann man einen groben Zusammenhang von insgesamt "sauberem" Wasser mit geringer Gentoxizität und "verschmutztem" Wasser mit höherer Gentoxizität feststellen. Auf der Basis von chemischen Summenparametern würden die Analyseergebnisse jedoch eher eine stärkere Gentoxizität in der Elbe vermuten lassen. Auch waren die Einzelkonzentrationen der oben erwähnten, mutmaßlich gentoxischen Verbindungen oft in der Elbe etwas höher. Eine höhere Gentoxizität zeigte sich aber bei

den Rhein-Proben - mit einer Zunahme stromabwärts, sodass andere Ursachen für die Gentoxizität angenommen werden müssen. Betrachtet man die Rheinproben für sich, so stimmt die Zunahme der Gentoxizität flussabwärts mit einer Zunahme der analytisch festgestellten Gesamtbelastung überein. In der Elbe lässt sich dagegen flussabwärts eher ein Verdünnungseffekt der organischen Kontamination feststellen. Dem entspricht am ehesten die Rangfolge in Tab. 16. Spezifischere, statistisch besser absicherbare Korrelationen zwischen Gentoxizität und Kontaminationen konnten mit den vorliegenden Daten nicht erreicht werden.

Die Ursachen dieser Kontaminationsprofile sind wohl zurückzuführen auf Einträge aus industriellen und kommunalen Kläranlagen beim Rhein beziehungsweise auf Einleitungen auf tschechischem Gebiet und späterer Verdünnung durch Zuflüsse bei der Elbe (Sacher et al. 2000). Ursachen für die analytisch nicht nachvollziehbaren Unterschiede zwischen Rhein und Elbe liegen vermutlich in gentoxischen Substanzen, für die hier keine oder nur teilweise Analysedaten vorliegen (z. B. Arzneimittel). Auch eine besondere Toxizität bestimmter Mischungen oder unspezifische Effekte, die die Zellen im Test möglicherweise sensibilisierten oder oxidativen Stress hervorrufen können, kommen in Frage (Eine eher "unverdächtige" Komponente, deren Konzentration im Rhein höher war als in der Elbe, war z. B. das Chlorid Cl^-). Als redox-aktive Bestandteile könnten z. B. anorganische Substanzen wie Nitrate, Fe und Mn eine Rolle gespielt haben. Möglicherweise können Nitrate und Nitrite auch erst beim Kontakt mit den Zellen zur Bildung gentoxischer Verbindungen wie z. B. Nitrosaminen geführt haben.

3.5.1.6 Unterschiede im jahreszeitlichen Verlauf

Über ein Jahr betrachtet (Wasserproben v. Feb. 97-Jan. 98) traten positive Ergebnisse und höhere Messwerte für Gentoxizität in den Monaten Mai bis August häufiger als in den übrigen Monaten auf: 10 Positive von 14 gegenüber 4 von 27 (Gesamtbewertung) (s. Abb. 29).

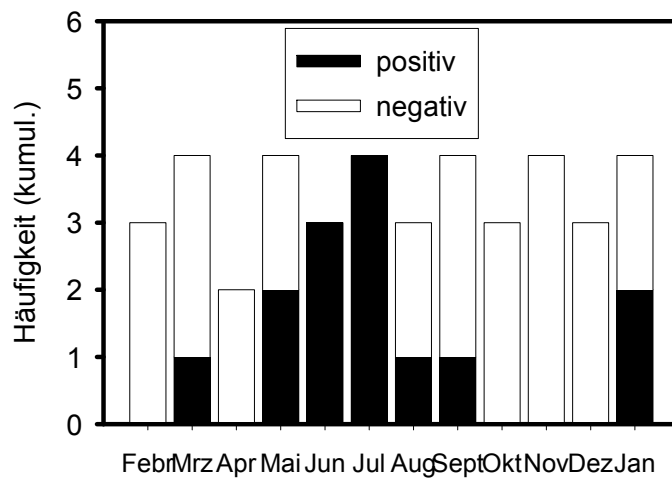


Abbildung 29: Häufigkeit positiver Testergebnisse im jahreszeitlichen Verlauf der Probennahmen. Dargestellt sind die Wasserproben aus Rhein und Elbe, die jeweils im 2-Monats-Rhythmus genommen wurden (s. Anhang 1).

3.5.1.7 Einfluss der Probenlagerung

Vor allem für die Rhein-Proben in den Monaten März, Mai und Juli - zeigte sich die Tendenz, dass die Werte des jeweils ersten Versuchsdurchgangs eine höhere DNA-Schädigung anzeigten, als die der folgenden Durchgänge. Vergleicht man alle 147 Wasserproben-Tests (= 3*49), so findet man bei 16,3 % der ersten, 10,2 % der zweiten und 8,8 % der dritten Versuchsdurchgänge positive Effekte, obwohl man ja einen gleichbleibenden Anteil erwarten könnte. Die Unterschiede zwischen den frisch getesteten und den übrigen Proben waren signifikant (s. Tab. 20, 21). Diese Beobachtung lässt sich wahrscheinlich auf biologische und chemische Abbau- bzw. Zerfallsprozesse während der Lagerung bzw. des Einfrierens und Auftauens zurückführen (Tab. 20).

Tabelle 20: Testergebnisse und Lagerungsdauer bzw. -art

Lagerung	Anzahl n	Positive	Negative	Anteil Positive
bis zwei Tage	17	12	5	71 %
länger als 2 d	48	16	32	33 %
aufgetaut	70	23	47	33 %
keine Angabe	12	1	11	8 %
Gesamt	147	52	95	35 %

Tabelle 21: Statistische Signifikanz im χ^2 -Test (Kontingenztafel, "Vierfelder-Test"). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 0,05$ ist der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant (zusätzlich mit * gekennzeichnet). Da die statistische Teststärke (engl. "Power") nicht 0,8 erreicht, müssen die Ergebnisse mit Vorbehalt interpretiert werden.

Positive Proben	χ^2 -Test	Statistische Teststärke (konventioneller Sollwert $\geq 0,8$)
frisch versus $\geq 2d$	* P = 0.017	0.665
frisch versus aufgetaut	* P = 0.010	0.737
$\geq 2d$ versus aufgetaut	P = 0.885	0.050

3.5.1.8 Kontaminierte Probe "Sanierungsgebiet Gaswerk Düsseldorf"

Die Proben vom Sanierungsgebiet Gaswerk Düsseldorf (August-Probe) wurden in das Testprogramm einbezogen, um die Reaktion des Testsystems auf eine eindeutig kontaminierte Probe zu überprüfen. Die Probe war stark mit BTEX kontaminiert: Die Konzentrationen im Rahmen eines chemischen Analysen-Programms lagen in folgenden Bereichen: Toluol zwischen 18 - 76,2 mg/l (20.08.1997: 46 mg/l); Xylol 15,1 - 27,1 mg/l (20.08.1997: 27,1 mg/l); Benzol 0,5 - 1,1 mg/l (20.08.1997: 0,5 mg/l); Ethylbenzol 0,88 - 1,4 mg/l (20.08.1997: 1,4 mg/l). Einzelne untersuchte PAHs wie z. B. BaP lagen jeweils unter der Nachweisgrenze (in einer Analyse des TZW unter $1,0 \mu\text{g/l}$ bzw. einer Analyse des ALGE einer früheren Probe vom selben Standort unter $0,2 \mu\text{g/l}$). Die Analyse einer früheren Probe vom selben Standort (ALGE, Analytisches Labor Gelsenkirchen) ergab aber einen summarischen PAH-Gehalt von 6,31 mg/l nach EPA, während der Wert nach TVO nur 0,0007 mg/l betrug.

Überraschenderweise zeigte sich nur eine niedrige Gentoxizität an RTG-2-Zellen und nur die Hälfte der Tests war positiv (Tab. 14 u. 15). Zytotoxizität konnte im FDA-Test nicht gefunden werden. Zur Absicherung wurden weitere Versuchswiederholungen mit der Probe vom 20.08.1997 durchgeführt. Von sechs Versuchen mit der Probe waren drei (leicht) positiv. Zum Vergleich wurden zusätzlich zur Routinetestung mit RTG-2-Zellen Versuche mit der Zelllinie RTL-W1 (zuvor βNF -induziert) durchgeführt. Diese Zelllinie zeigte eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber der Gaswerks-Probe als die RTG-2 (TM-Median = $25 \mu\text{m}$; siehe Abb. 30).

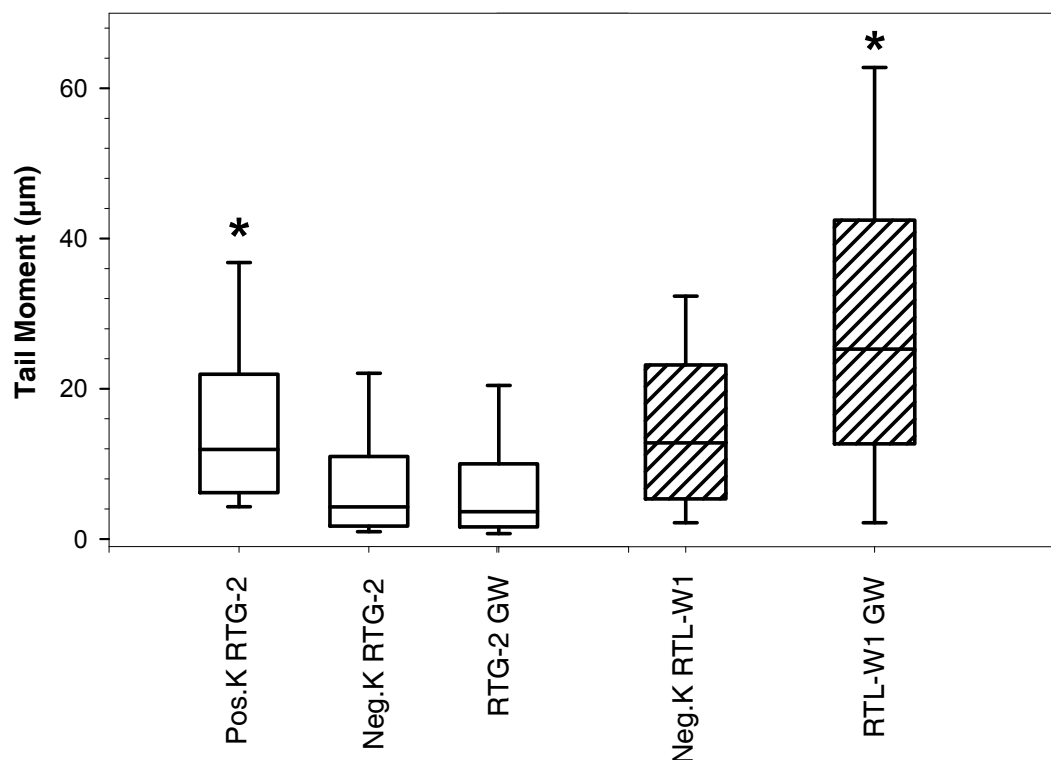


Abbildung 30: Gentoxizität der Sonderprobe „Gaswerk Düsseldorf“ II (vom 20.08.97) im Comet Assay an zwei Fischzelllinien. Grau: RTG-2; Schraffiert: RTL-W1 + β NF. Der Stern (*) gibt signifikante Erhöhung gegenüber der jeweiligen Negativkontrolle (K) an (statistisches Verfahren s. Methodenteil). Positivkontrolle (PosK): 20 μ g/l NQO.

3.5.2 Wirkungsbezogene Analytik/TIE: Sedimentextrakte

3.5.2.1 Beschreibung und Ziele

Eine weitere Anwendung des Comet Assay an komplexen Umweltgemischen war seine Einbindung in ein TIE-(Toxicity Identification and Evaluation-) Konzept, als einer von mehreren unterschiedlichen Biotests (siehe Brack et al. 1999 und Brack et al. 2000). In dem Verfahren sollten Sedimentextrakte aus dem Spittelwasser in der Chemieregion bei Bitterfeld - hier auf Gentoxizität - getestet werden. Generell ist das Ziel solch eines Konzeptes, durch eine sequenzielle bzw. zyklische Teststrategie von Biotest, Fraktionierung und chemischer Analytik sowohl toxische Wirkungen als auch deren chemische Ursachen zu ermitteln. Dieses Ziel ist von hoher Relevanz zur Behebung wesentlicher Probleme und Mängel bisheriger Verfahren der Umweltanalytik.

Sedimentextrakte stellen eine wichtige Probenart dar, da dort besonders lipophile Stoffe und Schwermetalle angereichert und über längere Zeit gespeichert werden können ("Gedächtnis des Gewässers"). Sie ergänzen die Untersuchungen von nativem Oberflächenwasser sinnvoll, da im Sediment vorhandene Schadstoffe nicht jederzeit,

aber doch potenziell im Oberflächenwasser verfügbar sein können bzw. das Sediment durch Wasserbewegungen u.a. in das Oberflächenwasser eingetragen werden kann.

Die Ziele in dieser Arbeit waren hier wiederum zunächst methodischen/explorativen Charakters, sekundär sollten Testergebnisse verwertet werden:

- Die Eignung des Assay für die acetonischen Sedimentextrakte sollte überprüft werden,
- Ein Testablauf des Assay im Rahmen des TIE-Verfahrens sollte entwickelt werden,
- Es sollte untersucht werden, ob die Sensitivität des Testsystems ausreicht, um auch in Unterfraktionen noch detektieren zu können,
- Die Frage, ob eines der Fischzellsysteme (RTG-2; RTG-2 + S9; β NF-induzierte RTL-W1-Zellen) eine besondere Eignung hinsichtlich Sensitivität und Praktikabilität zeigt, sollte beantwortet werden,
- Die mutmaßlich (und tatsächlich) stark kontaminierten Spittelwasser-Sedimentextrakte und Unterfraktionen sollten auf Gentoxizität geprüft werden,
- Die gentoxische Komponente einer der Fraktionen sollte exemplarisch im TIE-Testkonzept (sequenzielle bzw. zyklische Teststrategie, Ermitteln von Ursache und Wirkung) ermittelt werden.

3.5.2.2 Zytotoxizität

Der acetonische Gesamtextrakt von Sediment aus dem Spittelwasser erwies sich in einer Verdünnung von 1:500 als zytotoxisch im FDA-Test, sowohl an RTG-2- als auch an RTL-W1-Zellen. Die Viabilität fiel auf 50-0 % . Im Falle von 50 % Viabilität war die Anzahl der auszählbaren Zellen im FDA-Test deutlich verringert, sodass dort wegen Zellverlust von einer eigentlich noch höheren realen Zytotoxizität auszugehen ist. Die zytotoxische Schädigung schlug sich im Comet Assay als maximale DNA-Schädigung nieder (Tail Moment um 100 μ m, s. Tab. 22). In den Subfraktionen wurde die Zytotoxizitätsgrenze dagegen nicht überschritten.

Tabelle 22: Zytotoxizität des Sedimentextrakts F_{ges} aus dem Spittelwasser an β NF-induzierten RTL-W1-Zellen

Verdünnung (F_{ges})	Viabilität	Tail Moment
1:500	52 %	99
1:1000	67 %	87
1:2000	70 %	33

3.5.2.3 Gentoxizität der Extrakte an drei Fischzellsystemen

Wie oben bei der Beschreibung der Ziele erwähnt, wurden zur Untersuchung der Extrakte die drei Fischzellsysteme RTG-2; RTG-2 + S9; β NF-induzierte RTL-W1-Zellen eingesetzt.

Zum Fraktionierungsschema:

Der Gesamtextrakt (F_{ges}) wurde in 6 Hauptfraktionen (F1-F7) aufgetrennt, diese wiederum in Unterfraktionen. F1 enthielt die hydrophilsten, F7 die lipophilsten

Verbindungen, Entsprechendes gilt für die Subfraktionen zweiter Ordnung in aufsteigender Reihenfolge (s. 2.7.3 und Brack et al. 1999).

Der Gesamtextrakt (F_{ges}) und die Hauptfraktionen wurden in 1:250 bis 1:1000-Verdünnung an RTG-2-Zellen ohne und mit S9-Aktivierung und an RTL-W1-Zellen getestet:

RTG-2-Zellen ohne S9-Zusatz zeigten eine gentoxische Antwort sowohl in F_{ges} , als auch in einigen der Subfraktionen. Neben F_{ges} waren aber nur bei den Fraktionen F2 und F6 beide Versuchsdurchgänge positiv (Abb. 31).

Mit S9-Zusatz war die Gentoxizität dann gegenüber RTG-2 ohne Zusatz reduziert: Die Subfraktionen waren nicht gentoxisch, F_{ges} nur gering (Abb. 32). In diesem Fall kann man also nicht von einer S9-"Aktivierung" sprechen.

β NF-induzierte RTL-W1-Zellen reagierten am empfindlichsten: F_{ges} und sämtliche Hauptfraktionen verursachten dort in der 1:500-Verdünnung starke oder mittlere DNA-Schäden (Abb. 33). RTL-W1 + β NF wurde daher als weiter zu verwendendes Testsystem ausgewählt, wenn damit auch einige Nachteile gegenüber RTG-2-Zellen bezüglich Praktikabilität und Variabilität der Effekte hingenommen werden mussten.

Die Gentoxizität von F_{ges} konnte nicht eindeutig als spezifisch gentoxische Wirkung interpretiert werden, da der Gesamtextrakt auch zytotoxisch war (s.o.).

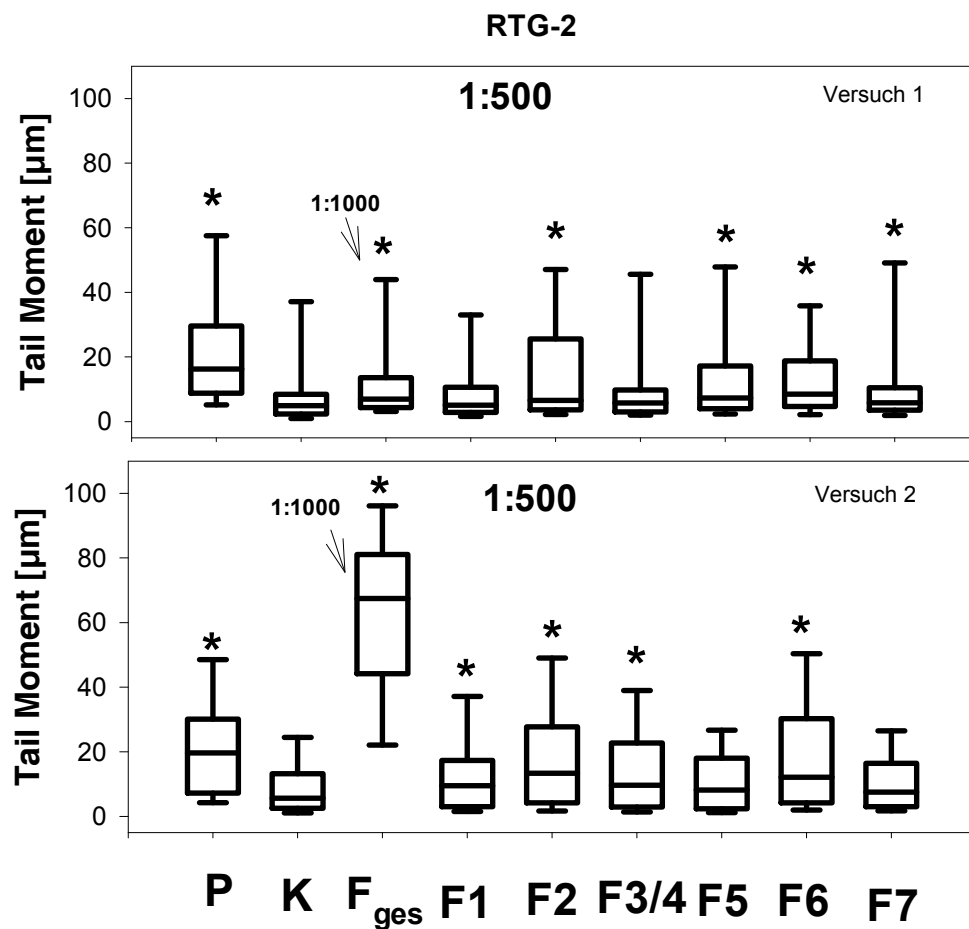


Abbildung 31: Gentoxizität des in Fraktionen aufgeteilten Extrakts aus dem Sediment des Spittelwassers (Industrieregion Bitterfeld) an RTG-2-Zellen. 2 Versuche, als Boxplots dargestellt. Verdünnungen der acetonischen Extrakte 1:500 bzw. 1:1000 (Pfeil). F_{ges} = Gesamtextrakt; F1-F7 = Fraktionen 1-7; P = Positivkontrolle; K = Negativkontrolle.

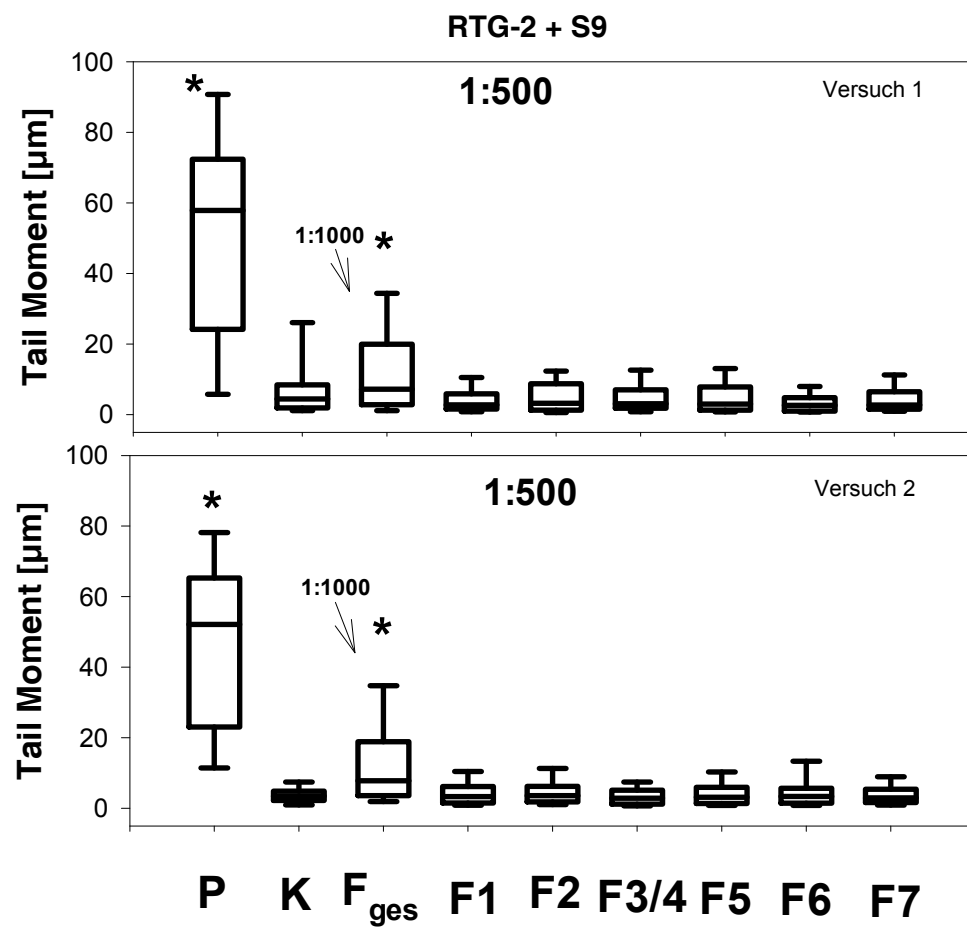


Abbildung 32: Gentoxizität der Sedimentextrakte wie in Abb. 31, jedoch an RTG-2-Zellen plus 1 % S9.

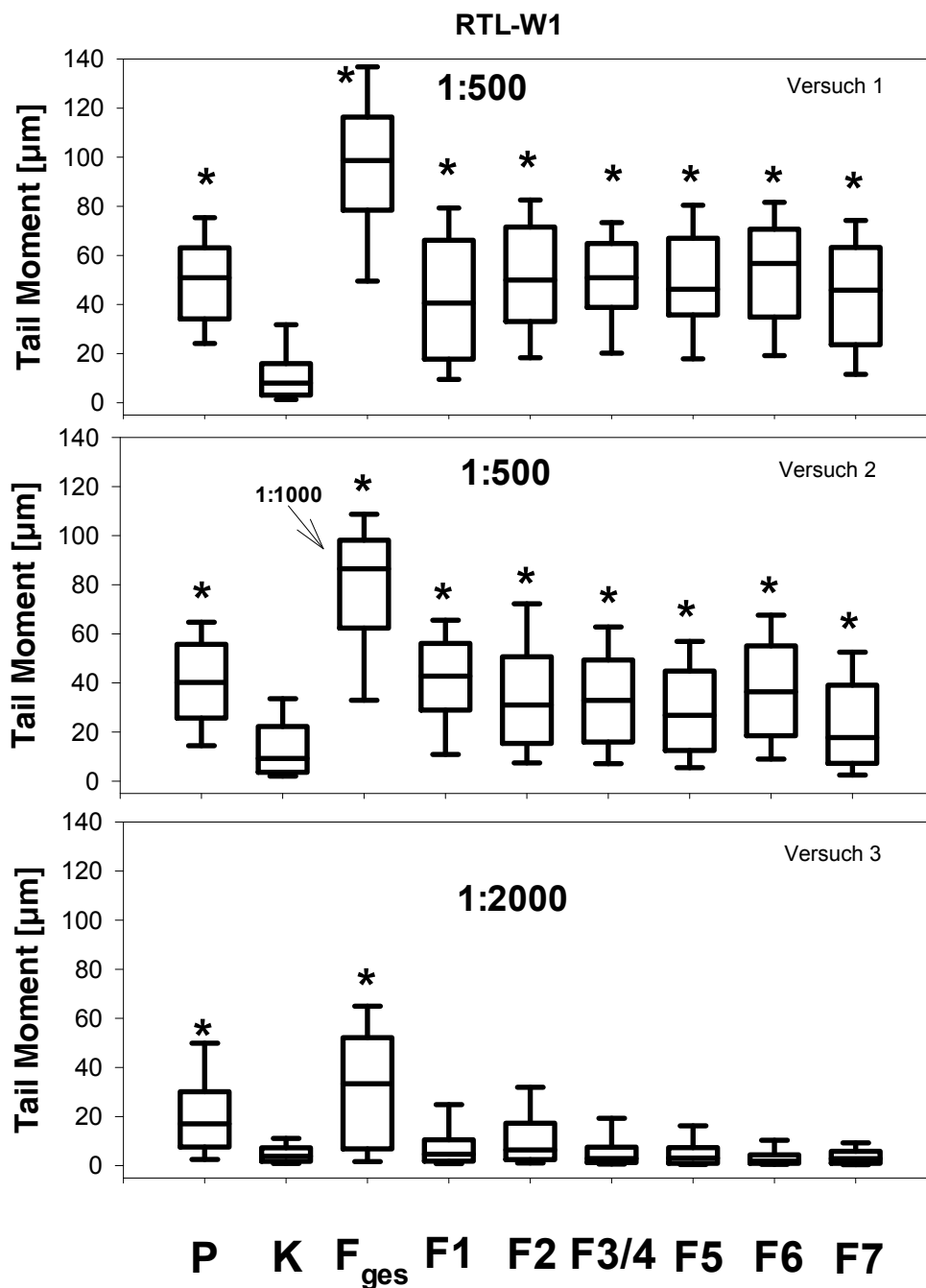


Abbildung 33: Gentoxizität der Sedimentextrakte wie in Abb. 31, jedoch an β NF-induzierten RTL-W1-Zellen. 3 Versuchswiederholungen mit den Verdünnungsstufen 1:500, 1:1000 (Pfeil) und 1:2000. Abkürzungen wie in Abb. 31

3.5.2.4 Exemplarische TIE-Untersuchung der Subfraktion F3

Beispielhaft wurde aus den gentoxischen Fraktionen nun die Fraktion 3 für eine weitere Analyse herausgegriffen und mit dem hier empfindlichsten System, RTL-W1, untersucht. Dazu wurden F3 und 6 Subfraktionen davon, F3.1-F3.6, getestet (Abb. 34). Die

Verdünnung wurde hier auf 1:250 verringert, um eine deutlichere Antwort zu erhalten, denn die Gesamtkonzentrationen der toxischen Stoffe verringern sich durch die Fraktionierung. Auch hier erwiesen sich mehrere Fraktionen als gentoxisch. Die am stärksten gentoxische Subfraktion war F3.6. Die chemische Analyse, der Fraktionen ergab Dimethylparathion als Hauptkomponente von F3 (Identifikationsschritt der TIE-Prozedur). Dimethylparathion ist ein Insektizid, das in Bitterfeld in einer Menge von ca. 10000 t/a produziert wurde (Dr. W. Enders, Bitterfelder Vermögensverwaltung Chemie GmbH, Bitterfeld, Vortrag am UFZ Leipzig 1998). Nun folgte der Evaluierungsschritt des TIE-Verfahrens: Die kommerziell erhältliche Reinsubstanz wurde getestet – und erwies sich als nicht gentoxisch (Abb. 35). Als Verdachtssubstanz ergab sich nun das Extraktionsmittel Tetrahydrofuran (THF), das bei Lagerung Peroxide bilden kann (W. Brack, UFZ Leipzig, persönl. Mitteilung) und damit als Radikalbildner gentoxisch sein könnte. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde THF eingedampft und der verbliebene Rückstand in Aceton gelöst und ebenfalls im Comet Assay überprüft (Abb. 35). Hier zeigte sich eine starke Gentoxizität - THF war also mit großer Wahrscheinlichkeit für die Gentoxizität der Subfraktion F3.6 verantwortlich.

Die hier (im Kapitel 3.5.2) angewandte Vorgehensweise ist noch einmal in Abb. 36 schematisch zusammengefasst.

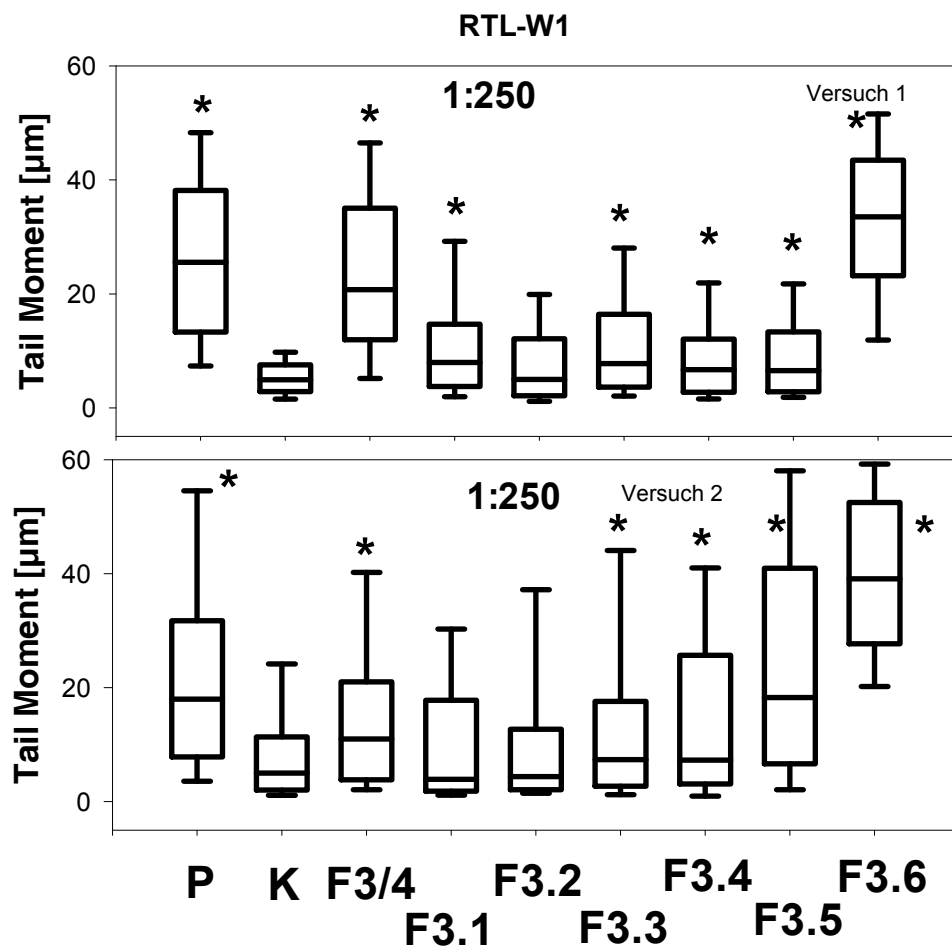


Abbildung 34: Gentoxizität der Subfraktion F3 aus Spittelwasser-Sediment und deren weiterer Subfraktionen an βNF -induzierten RTL-W1-Zellen. 2 Versuche als Boxplots dargestellt. Verdünnungen der acetonischen Extrakte 1:500 bzw. 1:2000. Abkürzungen wie in Abb. 31.

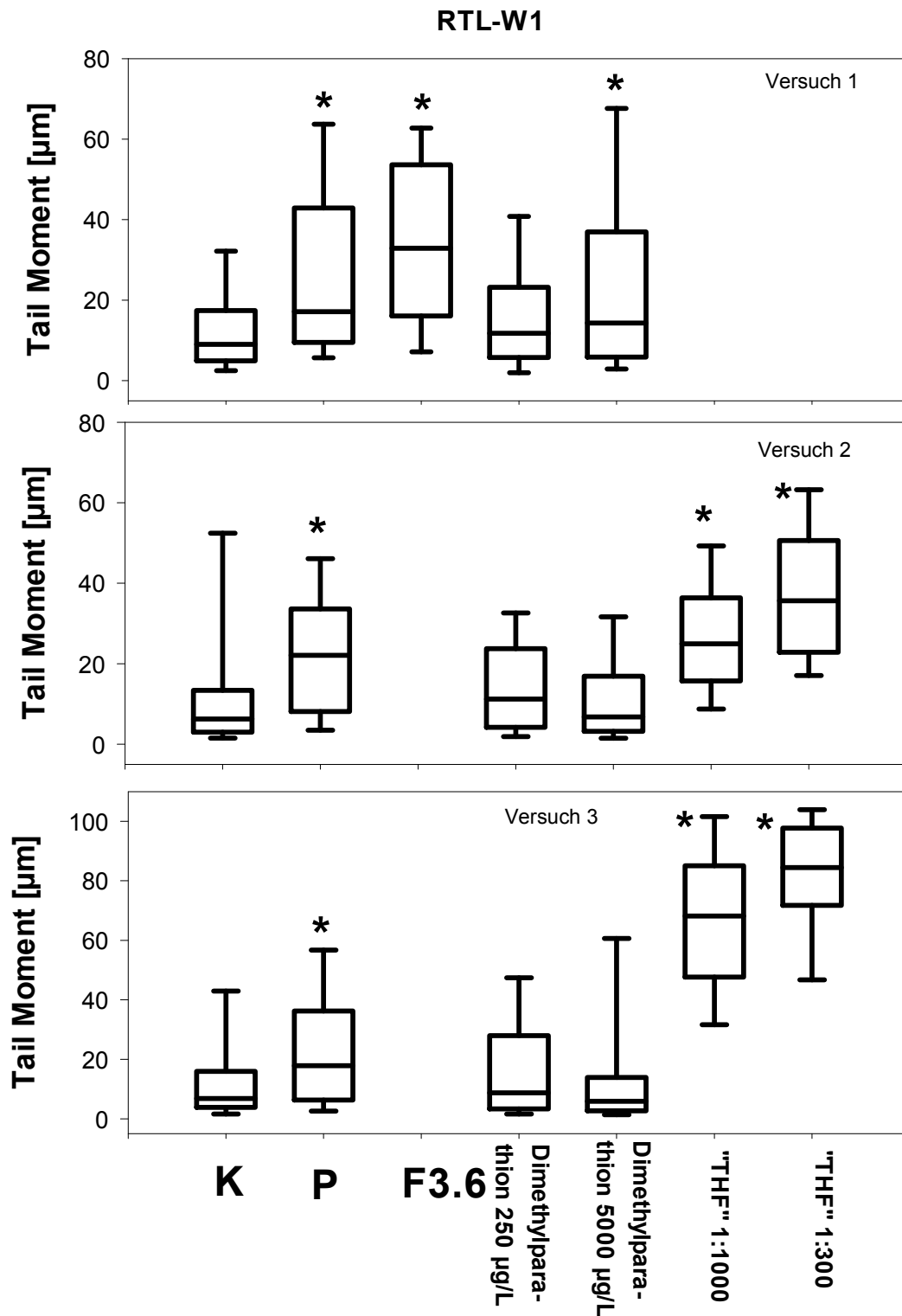


Abbildung 35: Evaluierungsversuch zur Gentoxizität der Subfraktion F3.6 aus dem Spittelwasser-Sediment und der verdächtigen Komponenten (Dimethylparathion und Eindampfungsrückstand von Tetrahydrofuran, "THF") an β NF-induzierten RTL-W1-Zellen. 3 Versuche als Boxplots dargestellt. Verdünnung des acetonischen F3.6: 1:500; sonstige Konzentrationen sind in der Graphik angegeben. Abkürzungen wie in Abb. 31.

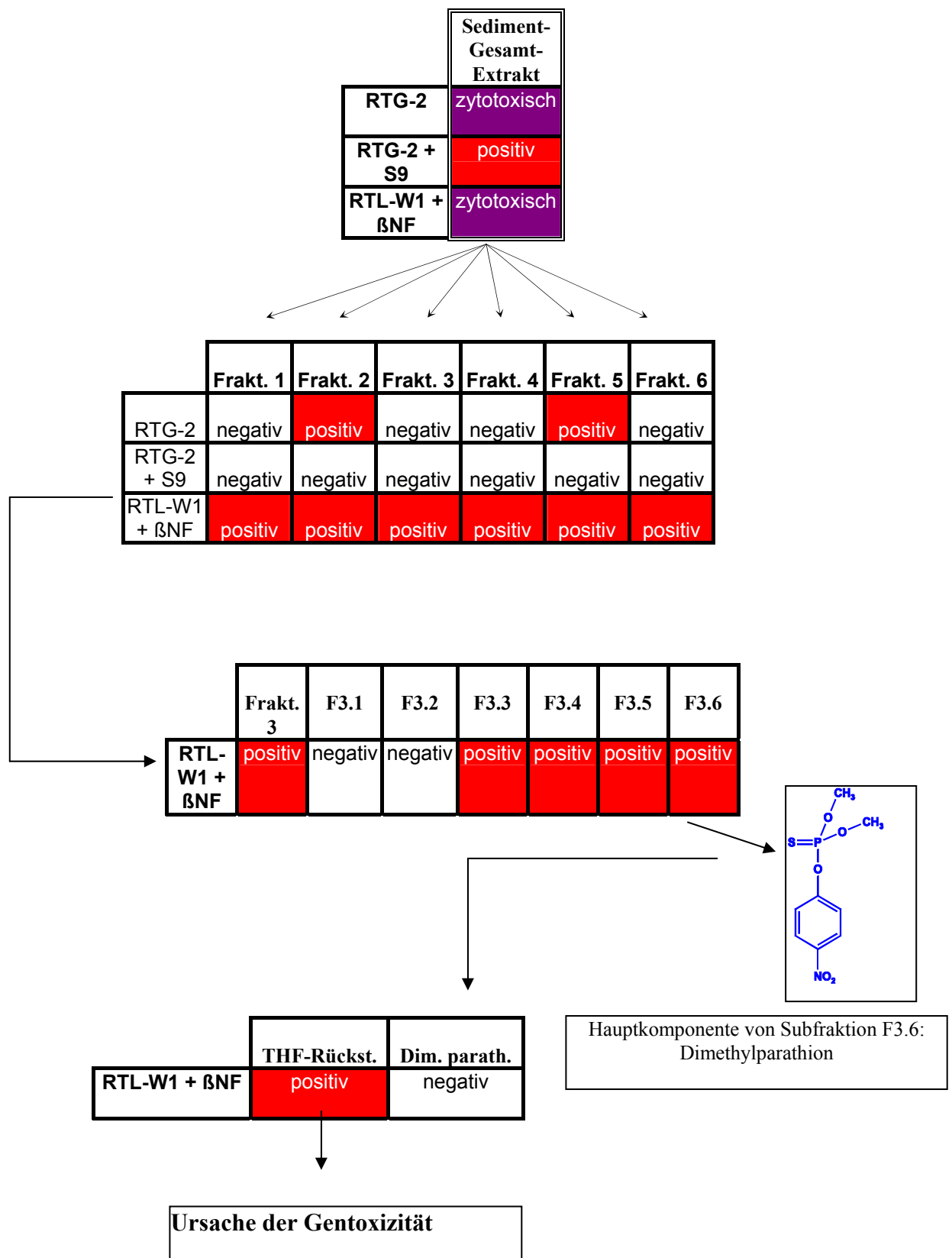


Abbildung 36: Zusammenfassung der wirkungsbezogenen Analytik (TIE = Toxicity Identification Evaluation) im Comet Assay. Details siehe Text.

3.6 Biomonitoring

3.6.1 Der Comet Assay im Kontext des Biomonitoring-Programms "PNETOX" - Fragestellung

Das Biomonitoring von freilebenden Döbeln (*Leuciscus cephalus*) aus der Mosel (Forschungsprojekt "PNETOX", programme national d'écotoxicologie, in Frankreich, 1998; Flammarion et al. 1998) hatte einerseits das Ziel, die Anwendung des Comet Assay methodisch auf die Bedingungen von Freilandforschung und *ex-vivo* gewonnene Blutzellen zu übertragen, andererseits sollte die gentoxische Belastung der Fische an vier verschiedenen Probenahmestellen der Mosel festgestellt werden. Als weitere Biomarker wurden bei den untersuchten Fischen des Projekts der Gehalt an Acetylcholinesterase (AChE) im Muskel und die 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase- (EROD-) Aktivität in der Leber gemessen. Diese Biomarker zeigen andere umweltrelevante, nicht-gentoxische Endpunkte, die jedoch indirekten Bezug zur Gentoxizität besitzen können (s.u.). Aus der Untersuchung mehrerer unterschiedlicher Biomarker ergab sich so ein breiter gefächertes Bild zur Charakterisierung der Kontaminations- bzw. Belastungssituation, als es allein durch eine Gentoxizitätsuntersuchung hätte erstellt werden können.

3.6.2 Übertragung der Methodik auf Blutzellen des Döbels

Der Comet Assay ließ sich, methodisch betrachtet, problemlos und mit wenigen Modifikationen von der bei den Zellkulturen angewandten Methode auf Erythrozyten von Döbeln übertragen und erwies sich auch nach dem Fischfang im Freiland mit anschließendem Transport der Blutproben als methodisch praktikabel. Abgesehen von dieser allgemeinen Übertragbarkeit sind Unterschiede in den Ergebnissen durch einzelne, spezifische methodische Parameter natürlich nicht ausgeschlossen.

Obwohl die Methode insgesamt gut übertragbar war, lassen sich die Ergebnisse in Form der Tail-Moment-Werte hier nicht unmittelbar mit den vorangegangenen Werten aus den Fischzellkultur-Versuchen vergleichen. Neben den biologischen Unterschieden (anderer Zelltyp) waren methodische Unterschiede im experimentellen Verfahren vorhanden. Im Gastlabor wurde eine vollständig andere Geräteausrüstung verwendet, wobei vor allem Elektrophoreseapparatur und Bildanalysesystem als wichtige Änderungen zu erwähnen sind. Im Ergebnis hatten die DNA-„Comets“ ein anderes, langgezogenes Erscheinungsbild und insgesamt entstand der subjektive, nicht näher untersuchte Eindruck, dass die Tail-Moment-Werte nicht mit denen aus den Zellkulturuntersuchungen im anderen Labor vergleichbar waren.

3.6.3 Methodische und biologische Einflüsse auf die DNA-Schädigung im Comet Assay

Als mögliche Einflüsse wurden der Einfluss des Blutprobenvolumens und des Geschlechts der Fische auf die DNA-Schädigung im Testergebnis statistisch untersucht.

3.6.3.1 Hat das Probenvolumen einen Einfluss?

Bei der praktischen Durchführung des Assay im Biomonitoring kam der Verdacht auf, dass im Falle kleiner Probenvolumina der Blutproben möglicherweise ungünstige Einflüsse aufgetreten sind, denn gerade bei kleinen Fischen - bei denen wenig Blut entnommen werden konnte - lag ein besonders hoher DNA-Schaden vor (Abb. 39). Das Problem bei der Gewinnung und Verarbeitung dieser Proben bestand z. B. darin, dass z.T. starkes Saugen mit der Kanüle notwendig war und sich ein Verhältnis von Luft zu Probe im Eppendorf-Gefäß ergab, das relativ groß war (z. B. nur 0,1 ml Füllung bei 1,5 ml Gesamtvolumen), sodass sich die Probe sehr stark über die innere Oberfläche des Gefäßes verteilen konnte. In der vorliegenden Untersuchung waren die Fische mit den stärksten DNA-Schäden drei Männchen unter 65 g Körpergewicht. Die Proben mit den stärksten DNA-Schäden besaßen eher kleine Volumina, z. B. 0,8; 0,25; 0,15 und 0,1 ml bei den vier am stärksten geschädigten Proben.

Es wurden drei statistische Auswertungsmethoden angewandt, um die Frage eines Einflusses des Probenvolumens zu klären:

- 1) Die 11 Blutproben mit den stärksten DNA-Schäden wurden ausgewählt und daraufhin überprüft, ob das Probenvolumen bei diesen Proben signifikant kleiner war, als bei den übrigen 64 Proben. In dieser Berechnung (Mann-Whitney Rangsummentest) ergab sich kein signifikant kleineres Volumen dieser Proben ($p = 0,330$).
- 2) Die genannten 11 Proben wurden daraufhin überprüft, ob dort Probenvolumina < 1 ml häufiger vorkamen, als in den restlichen 64 Proben. Das Ergebnis war nicht signifikant ($p = 1,0$ in Fischers exaktem Test).
- 3) Es wurde die generelle Korrelation zwischen Probenvolumen und DNA-Schaden bei allen 75 Proben untersucht. Hier konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden (Pearson Product Moment Korrelation, $p > 0,050$).

Fazit: Es konnte nicht belegt werden, dass die Zellen in geringvolumigen Proben einen gegenüber dem Durchschnittsvolumen oder größerem Probenvolumen gesteigerten DNA-Schaden hatten. Dennoch ist trotz der fehlenden Signifikanz ein Einfluss im Einzelfall nicht ausgeschlossen. Es ist daher zu empfehlen - besonders bei geschlechts-, gewichts- oder altersspezifischen Untersuchungen - ein bestimmtes Volumen nicht zu unterschreiten und Luft im Probengefäß möglichst auszuschließen (tatsächlich ist dies in der Folgeuntersuchung 1999 so gemacht worden).

3.6.3.2 Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede

Die Frage, ob eine Abhängigkeit des DNA-Schadens vom Geschlecht der Fische bestand, war einerseits methodisch, andererseits biologisch relevant: In zukünftigen Untersuchungen könnte es sich als praktische (d. h. weniger zeit- und arbeitsaufwendige) Methode erweisen, eine Gentoxizitätsuntersuchung ohne Bestimmung des Geschlechts der Tiere durchzuführen, daher sollte untersucht werden, ob dies prinzipiell möglich ist. Andererseits soll hier das Verhältnis der Gentoxizität zu geschlechtsspezifischen Faktoren wie z. B. den anderen Biomarkern, welche

geschlechtsspezifisch beeinflusst werden können, statistisch untersucht und diskutiert werden.

Gewicht und Größe: Männchen und Weibchen wiesen einen deutlichen und hochsignifikanten Unterschied in Bezug auf Körpergewicht und Größe auf (Medianwert bei den Männchen: 100 g; bei den Weibchen: 442 g; $n = 34$ Weibchen + 41 Männchen; $p < 0,001$ im Mann-Whitney-Rangsummentest; Abb. 37). Das Gewicht der Fische stand in einem gesetzmäßigen Zusammenhang mit der Körperlänge (und umgekehrt) (Abb. 38).

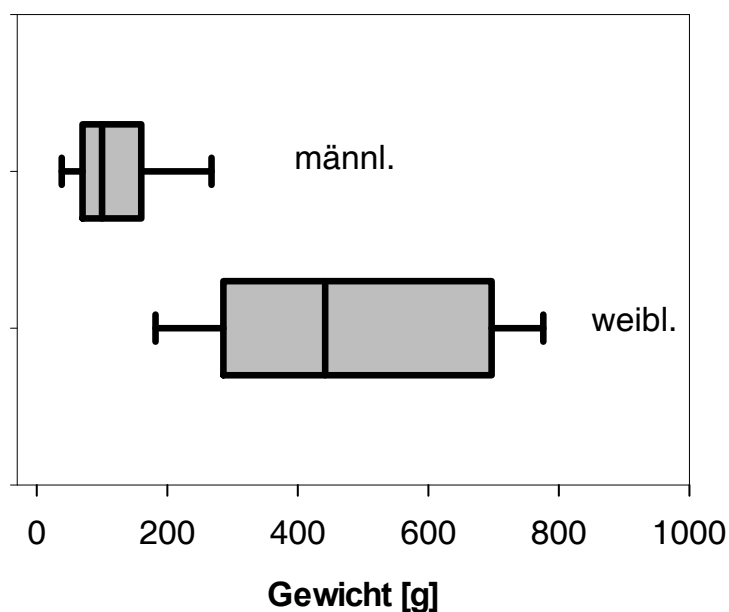


Abbildung 37: Geschlechtsspezifische Unterschiede im Körpergewicht von *Leuciscus cephalus* aus der Mosel im Biomonitoring-Programm "PNETOX" 1998. Einzelheiten siehe Text.

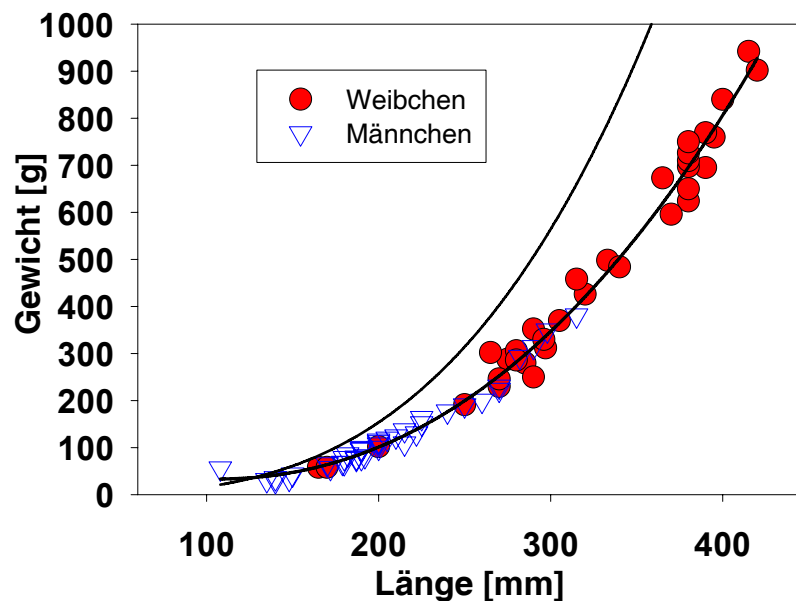


Abbildung 38: Zusammenhang zwischen Körperlänge und -gewicht von *Leuciscus cephalus* aus der Mosel im Biomonitoring-Programm "PNETOX" 1998. Zu beachten ist der Unterschied zwischen Männchen und Weibchen. Dieser Zusammenhang lässt sich mit der folgenden Formel beschreiben (n = 75; nichtlineare, polynomiale Regression mit dem Programm SigmaPlot, Version 4.0):

$$g = g_0 + a l + b l^2 + c l^3;$$

wobei l = Länge; g = Gewicht; $g_0 = 110,08$; $a = -1,366$; $b = 5,44 \cdot 10^{-3}$; $c = 5,81 \cdot 10^{-6}$.

Zum Vergleich mit Ergebnissen der Untersuchungen von Habashy (1974; n = 665 Döbel in der damaligen Tschechoslowakei) ist der dort gefundene Zusammenhang

$$\log g = -1,99 + 3,21 \log l$$

in der oberen, steiler verlaufenden Kurve dargestellt.

Damit die folgenden Fragestellungen zu den Korrelationen von DNA-Schäden mit dem Geschlecht und dem Alter der Fische verständlich werden, müssen hier die Ergebnisse zu Geschlecht, Körpergewicht und -länge kurz interpretiert und diskutiert werden: Der Gewichtsunterschied zwischen Weibchen und Männchen kann als Sexualdimorphismus interpretiert werden, der jedoch vor allem mit der Altersstruktur zusammenhängt. Nach den Untersuchungen von Habashy (1974) und Philippart (1972) sind die Körperlänge bzw. das Gewicht der Fische mit dem Alter korreliert. Das Alter wurde in diesen Untersuchungen scalimetrisch (anhand der Schuppen) bestimmt - eine solche Altersbestimmung wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht vorgenommen. Der Gewichtsunterschied beruht demnach vor allem auf einem unterschiedlichen Durchschnittsalter von Männchen und Weibchen. Die Weibchen erreichen ein höheres Alter als die Männchen (Weibchen z. B. 15 Jahre, Männchen z. B. 8 Jahre). Der Sexualdimorphismus bezüglich der Größe ist wohl weniger ausschlaggebend, wenn man Fische gleichen Alters vergleicht. Dennoch ist der hier gefundene Unterschied zwischen den Geschlechtern recht drastisch und liegt höher, als aus der genannten Literatur zu entnehmen ist. Aber auch in der Literatur wird auf Standortunterschiede, Einflüsse von Verschmutzung und Einflüsse beim Fangen hingewiesen. Standortunterschiede und Umwelteinflüsse könnten auch der Grund für den Unterschied der Gewichts-Längen-Relation der Untersuchungen sein (s. Abb. 38)

DNA-Schädigung: Das Ergebnis der Untersuchung mit dem Comet Assay zeigte keine signifikanten Unterschiede der DNA-Schädigung zwischen Fischen unterschiedlichen Geschlechts (Tab. 23; auch Flammarrion et al. 1998 kommen über eine andere Berechnungsmethode auf das gleiche Ergebnis).

Tabelle 23: DNA-Schaden (Tail Moment/ μm) bei den Geschlechtern der Fische aller Probestationen und Test auf signifikanten Unterschied zwischen Männchen und Weibchen. n.s.: Unterschied zwischen den Geschlechtern nicht signifikant

		Median des Tail Moment (μm)	Irrtumswahrscheinlichkeit und Signifikanz (Mann-Whitney-Rangsummentest)
Alle Stationen	Männchen	18,85	P = 0.943; n.s.
	Weibchen	18,69	
Eloyes	Männchen	25,73	P = 0.385; n.s.
	Weibchen	26,92	
Archettes	Männchen	26,42	P = 0.141, n.s.
	Weibchen	17,07	
Igney	Männchen	16,51	P = 0.543; n.s.
	Weibchen	19,13	
Velles	Männchen	10,68	P = 0.077; n.s.
	Weibchen	13,44	

3.6.3.3 Bestehen Korrelationen zwischen Körpergröße/-gewicht, dem Alter und DNA-Schäden?

Körperlänge und -gewicht von Fischen sind Grundparameter, die wiederum mit vielen anderen biologischen und physiologischen Parametern in Zusammenhang stehen. Korrelationen zwischen den gemessenen DNA-Schäden und Länge bzw. Gewicht sind daher von Interesse, aber auch, wenn man sie unter dem Gesichtspunkt der Altersabhängigkeit betrachtet. Denn diese Größenparameter sind - wie oben gesagt - auch Funktionen des Alters der Fische. Habashy (1974) zeigte sogar, dass die Relation zwischen Körperlänge und dem Alter bei Döbeln nach dem ersten Lebensjahr ungefähr linear verläuft. Ein Rückschluss von der Körperlänge auf das Alter erscheint also relativ einfach. Kennt man die Relation zwischen Körperlänge und -gewicht, kann man vom Gewicht ebenfalls auf das Alter schließen.

Die Ergebnisse zu den fehlenden Geschlechtsunterschieden beim DNA-Schaden lassen vermuten, dass auch keine Abhängigkeiten des DNA-Schadens von der Größe bzw. dem Gewicht der Fische bestanden, da die Weibchen gleichzeitig die größten Tiere waren. Dennoch wurden mögliche Korrelationen von Gewicht und DNA-Schaden bzw. Körperlänge und DNA-Schaden genauer untersucht, indem die statistisch untersuchten

Gruppen weiter aufgetrennt wurden (Tab. 25 bzw. Tab. 24). Dabei wurde für die Gruppe aller Weibchen ein statistisch signifikanter Anstieg des DNA-Schadens mit der Körperlänge festgestellt ($K = 0,376$; $p = 0,0284$; Tab. 24, Abb. 39). In der Gruppe aller Männchen schien der DNA-Schaden mit der Länge dagegen abzunehmen ($K = -0,348$; $p = 0,0301$; signifikant). Alle anderen Gruppierungen - einschließlich der Weibchen, die getrennt nach Probenahmestellen untersucht wurden (s. Tab. 24), wiesen aber keinerlei signifikanten Zusammenhang zwischen Länge und DNA-Schaden auf. Es bestand also sowohl für die Gesamtheit der Weibchen als auch der Männchen ein auffälliger Gegensatz zu den übrigen Vergleichen. Daher wurde besonderer Augenmerk auf die Längenverteilung bei den einzelnen Probestationen gelegt. Dabei wurde deutlich, dass die Weibchen der Station Eloyes eine signifikant größere Länge als die Weibchen der anderen Stationen hatten (Kruskal-Wallis-One-Way ANOVA on Ranks und All Pairwise Multiple Comparison nach Dunn; Abb. 39b) (Anmerkung dazu: Der Längenunterschied beruht vermutlich auf einem höheren Alter dieser Fische). Gleichzeitig hatten diese Weibchen die höchste DNA-Schädigung gegenüber den Weibchen der übrigen Stationen, aber nur gegenüber der Station Velle-sur-Moselle war dies auch statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-One-Way ANOVA on Ranks und All Pairwise Multiple Comparison nach Dunn). Der hier gefundene Anstieg der DNA-Schädigung mit der Körperlänge ist also durch den höheren DNA-Schaden bei den Weibchen der Station Eloyes entstanden. Dass ein biologischer, kausaler Zusammenhang zwischen DNA-Schaden und Körperlänge - respektive Alter - besteht, kann hier dagegen nicht erwiesen werden. Dies wird auch durch Folgendes noch einmal bestätigt: Sowohl, wenn man die Korrelation bei der Gruppe aller *nicht* aus Eloyes stammenden Weibchen, als auch die Gruppe der Weibchen aus Eloyes für sich untersucht, ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen DNA-Schädigung und Körperlänge (zu beachten sind die stark voneinander abweichenden Korrelationskoeffizienten; siehe Tab. 24). Allerdings kann die Frage nach einem Zusammenhang zwischen Alter und DNA-Schaden nicht endgültig verneint werden (besteht ein Zusammenhang, so ist der altersbedingte Unterschied jedenfalls vermutlich nicht groß oder es besteht ein sprunghafter Anstieg). Auch bleibt offen, ob das Auftreten größerer Weibchen in Eloyes zufällig war.

Der signifikante Abfall des DNA-Schadens mit zunehmender Körperlänge bei den Männchen ließ sich ebenfalls nicht in den Einzelgruppierungen bestätigen (Tab. 24). Offenbar war diese Tendenz statistisch vor allem durch einige leichte Tiere mit besonders hohem DNA-Schaden verursacht (Abb. 39). Folglich kann auch hier kein allgemeiner Zusammenhang angenommen werden, sondern entsprechend auffällige Tiere müssten einzeln untersucht werden.

Körpergewicht: Da der Zusammenhang zwischen Körperlänge und -gewicht gesetzmäßig war (s. Abb. 38), könnten die Werte für die Korrelationen zwischen DNA-Schaden und Gewicht theoretisch wohl auch aus den gemachten Angaben hergeleitet werden. Der Zusammenhang lässt ein ähnliches Bild für die Korrelation DNA-Schaden/Gewicht vermuten, wie für die Korrelation von DNA-Schaden/Länge. Und dies wurde auch in den Berechnungen bestätigt (s. Tab. 25): Analog bestand hier eine signifikante positive Korrelation des DNA-Schadens mit dem Gewicht ($K = 0,4490$; $p = 0,0077$; Tab. 25) in der Gruppe aller Weibchen, die sich in den anderen Gruppierungen nicht bestätigen ließ. Die Unterschiede in der Analogie zu den Korrelationen mit der Länge lassen sich vor allem dadurch zusammenfassen, dass in den meisten Fällen die

Irrtumswahrscheinlichkeiten p in den Signifikanztests höher lagen, wenn das Körpergewicht anstelle der Körperlänge zur Berechnung der Korrelationen mit dem DNA-Schaden herangezogen wurde (vgl. Tab. 24 und 25). Z. B. ergab sich für die Gruppe aller Männchen auch hier eine Abnahme des DNA-Schadens, jedoch war diese Abnahme nicht mehr signifikant. Wenn der DNA-Schaden mit dem Parameter "Körpergröße" korreliert werden soll, erscheint es aus statistischer Sicht sinnvoll, eher die Körperlänge als Maß heranzuziehen, als das Körpergewicht, besonders auch im Hinblick auf Rückschlüsse über das Alter der Fische, da hier ein ungefähr linearer Zusammenhang zwischen Alter und Länge anzunehmen ist (s.o.)

Tabelle 24: DNA-Schaden der untersuchten *L. cephalus* in Abhängigkeit von der **Körperlänge**. Die Signifikanz wurde über eine Pearson Produkt-Moment-Korrelation (Statistikprogramm SigmaStat 2.0, Fa. Jandel Scientific) berechnet. n.s.: Korrelation ist nicht signifikant.

	Anzahl n	Korrelationskoeffizient	p	Signifikanz ($p < 0,05$)
Alle	73	-0,107	0,369	n.s.
Weibchen	34	0,376	0,0284	signifikant
Männchen	39	-0,348	0,0301	signifikant
Eloyes	20	0,171	0,472	n.s.
Archettes	15	-0,415	0,124	n.s.
Igney	20	-0,0507	0,832	n.s.
Velles	20	0,431	0,0740	n.s.
Eloyes Weibchen	10	-0,342	0,334	n.s.
Archettes Weibchen	6	0,177	0,738	n.s.
Igney Weibchen	9	-0,207	0,593	n.s.
Velles Weibchen	9	0,282	0,462	n.s.
Eloyes Männchen	10	-0,257	0,473	n.s.
Archettes Männchen	9	-0,282	0,462	n.s.
Igney Männchen	11	0,0746	0,828	n.s.
Velles Männchen	9	0,183	0,637	n.s.
alle Weibchen außer Eloyes	24	-0,0290	0,893	n.s.

Tabelle 25: DNA-Schaden der untersuchten *L. cephalus* in Abhängigkeit vom **Körpergewicht**. Die Signifikanz wurde über eine Pearson Produkt-Moment-Korrelation (Statistikprogramm SigmaStat 2.0, Fa. Jandel Scientific) berechnet. n.s.: Korrelation ist nicht signifikant.

	Anzahl n	Korrelationskoeffizient	p	Signifikanz (p < 0,05)
Alle	75	0,0260	0,8250	n.s.
Weibchen	34	0,4490	0,0077	signifikant
Männchen	41	-0,2230	0,1610	n.s.
Eloyes	20	0,1740	0,4630	n.s.
Archettes	15	-0,3210	0,2430	n.s.
Igney	20	-0,0699	0,7700	n.s.
Velles	20	0,3300	0,1550	n.s.
Eloyes Weibchen	10	-0,2590	0,4700	n.s.
Archettes Weibchen	6	0,0324	0,9510	n.s.
Igney Weibchen	9	-0,2180	0,5730	n.s.
Velles Weibchen	9	0,2220	0,5670	n.s.
Eloyes Männchen	10	-0,3160	0,3730	n.s.
Archettes Männchen	9	-0,1740	0,6540	n.s.
Igney Männchen	11	0,0488	0,8870	n.s.
Velles Männchen	11	-0,0470	0,8910	n.s.
alle Weibchen außer Eloyes	24	0,0496	0,8180	n.s.

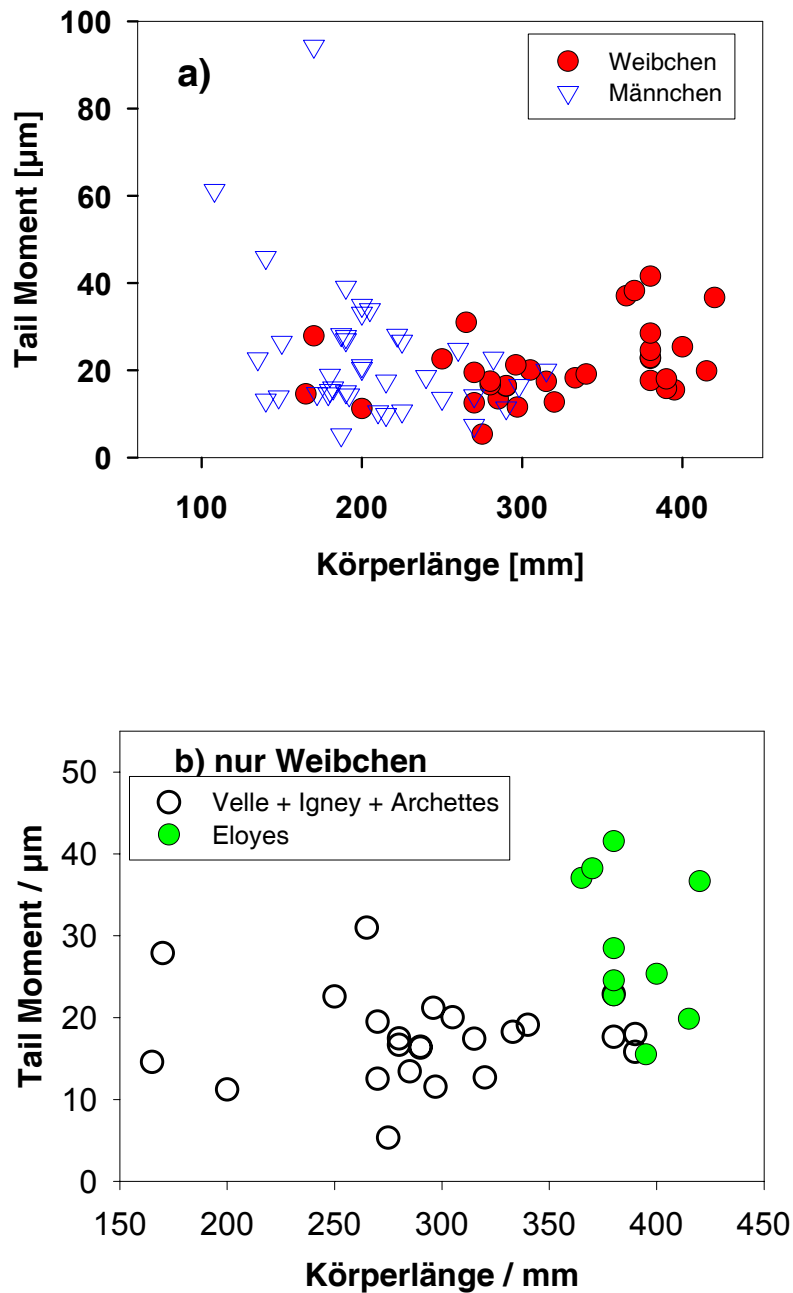


Abbildung 39: a) Beziehung zwischen DNA-Schaden und Körperlänge der Fische (*L. cephalus*, alle Stationen). Männchen (Dreiecksymbole) und Weibchen (Kreissymbole). Bei den Gruppierungen nach einzelnen Probenahmestationen konnte ein Zusammenhang zwischen Länge und DNA-Schädigung bei den Weibchen nicht festgestellt werden. Auffällig sind einige Männchen von geringer Größe, aber hohem DNA-Schaden, die wahrscheinlich die Ursache für die signifikante Abnahme des DNA-Schadens mit der Länge sind (Problematisierung siehe Text).

b) Darstellung der Weibchen: Es scheint ein signifikanter Zusammenhang zwischen Länge und DNA-Schaden bei den Weibchen ($K = 0,376$; $p = 0,0284$) zu bestehen, jedoch kommt dieser Eindruck wahrscheinlich nur durch größere Weibchen der Station Eloyes zustande (ausgefüllte Kreissymbole), wo gleichzeitig die stärksten DNA-Schädigungen auftraten. Diese waren aber nur gegenüber Tieren aus Velle-sur-Moselle statistisch signifikant höher.

Zusammenfassung:

Es ergab sich eine statistische Korrelation zwischen den beiden Parametern DNA-Schädigung und Körperlänge bzw. -gewicht innerhalb der Gruppe aller untersuchten Weibchen, die aber wahrscheinlich auf die inhomogene Größenverteilung bei den Fischen unterschiedlicher Probenahmestellen (mit unterschiedlicher DNA-Schädigung) zurückzuführen war. Letztendlich konnte kein Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung mit der Körperlänge oder mit dem Körpergewicht festgestellt werden.

Bei einzelnen kleinen (leichten) Männchen traten besonders hohe DNA-Schäden auf, aber ein allgemeiner Zusammenhang zwischen Körpergröße und Intensität des im Comet Assay gemessenen gentoxischen Schadens war nicht feststellbar. Über die Ursachen der hohen Schädigungen bei den kleinen Männchen kann nur spekuliert werden. Um jedoch Interpretationsprobleme in Bezug auf toxikologische Ursachen (z. B. eine besondere Empfindlichkeit kleiner Fische) in Zukunft auszuschließen, sollten mögliche methodische Probleme, wie oben (3.6.3.1) am Beispiel kleiner Blutproben volumina angesprochen, umgangen werden.

Da die Körperlänge bei *L. cephalus* relativ streng mit dem Alter korreliert ist (Habashy 1974), liegt die Annahme nahe, dass auch eine Korrelation des DNA-Schadens mit dem Alter der Fische unwahrscheinlich ist - dennoch sollte dies mit weiteren Daten untermauert werden.

Für Biomonitoring-Untersuchungen auf Gentoxizität scheinen weder die Größen- noch die Geschlechtshomogenität resp. -heterogenität in den Gruppen eine Rolle zu spielen. Dies könnte als praktischer Vorteil zur Vereinfachung von zukünftigen Biomonitoring-Studien genutzt werden: Möglicherweise kann auf eine Geschlechts- und Gewichtsbestimmung bei *L. cephalus* verzichtet werden, wenn die Gentoxizität der einzige interessierende Parameter ist. Ein "Pooling" der Daten ist möglich und die Gentoxizität kann evtl. nicht-destruktiv (ohne die Tiere zu töten) gemessen werden. Selbstverständlich würde ein gewisser Informationsverlust dabei in Kauf genommen werden müssen.

3.6.4 Gentoxizität bei den Fischen der verschiedenen Probenahmestellen

Das Hauptziel des Biomonitoring-Abschnittes der vorliegenden Arbeit war die Feststellung der gentoxischen Belastung der Fische an den verschiedenen Probenahmestellen entlang der Mosel. Die vorher gewonnenen Erkenntnisse zu biologischen Zusammenhängen (z. B. mit dem Alter der Fische, 3.6.3.1) und zur Optimierung der Testbedingungen (z. B. Verwendung getrockneter Objektträger) sollten dabei eingearbeitet werden. Außerdem sollte die Messung wiederum dem Ziel dienen, die gentoxische Belastung an den vier Probenahmestellen in Bezug zur unterschiedlichen chemischen Kontamination und zu den unterschiedlichen Ergebnissen bei den anderen Biomarkern zu setzen.

Für die Fische von den vier Stationen Eloyes (n = 20 Fische), Archettes (n = 15), Igney (n = 20) und Velle-sur-Moselle (n = 20) (Reihenfolge stromabwärts) ergab sich anhand der Medianwerte insgesamt eine Zunahme der DNA-Schädigung in umgekehrter

Reihenfolge, also stromaufwärts, wobei die mittleren beiden Stationen gleichauf lagen (Abb. 40 und Tab. 26). Die Signifikanztests bestätigten dies aber nur begrenzt: Ausschließlich die Station Velle-sur-Moselle unterschied sich statistisch signifikant von allen übrigen Stationen: Die Fische dort hatten nur die Hälfte bis zwei Drittel der DNA-Schädigung in den Erythrozyten (bezogen auf den Median); die restlichen Stationen unterschieden sich im gegenseitigen Vergleich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks, $p \leq 0,001$ und All Pairwise multiple Comparison nach Dunn, $p < 0,05$) (das Ergebnis stimmt mit dem von Flammarion et al. 1998 überein, wo die Daten aus unserer Untersuchung mit einer anderen Berechnungsmethode ausgewertet wurden).

Tabelle 26: DNA-Schädigung (Tail Moment / μm) in Erythrozyten von *Leuciscus cephalus* an vier Probenahmestellen der Mosel im Programm "PNETOX" 1998 (vgl. Abb. 40)

	Velle-sur-Moselle	Igney	Archettes	Eloyes
Anzahl n =	20	20	15	20
Median	12,61	18,55	18,54	26,01
Maximum	19,50	39,04	94,27	41,57
Minimum	5,22	14,35	11,23	15,51
5 %Quantil	5,34	14,58	12,57	19,64
95 %Quantil	17,74	33,41	71,15	38,40

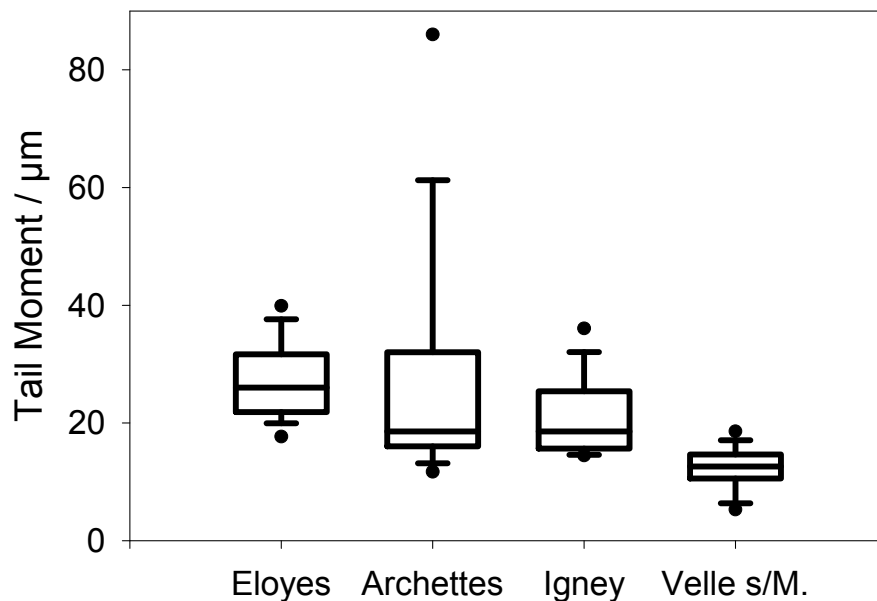


Abbildung 40: DNA-Schädigung im Comet Assay an Erythrozyten von *Leuciscus cephalus* an vier Probenahmestellen der Mosel im Programm "PNETOX" 1998. Die Boxplots repräsentieren n = 15 Fische für die Station Igney bzw. je 20 Fische für die übrigen Stationen

Die angezeigten DNA-Schäden mit Tail-Moment-Medianwerten von 13-26 μm erscheinen im Vergleich zu den Versuchen mit Zellkulturen (vorangegangene Kapitel) als relativ hohe Werte. Aus den oben (3.6.2) erwähnten Gründen ist aber eine solche Vergleichbarkeit der Werte hier nicht gegeben. Vergleichswerte sind aber durch einige entsprechende Untersuchungen an *L. cephalus* in anderen französischen Flüssen gegeben: Velle-sur-Moselle hat danach ein eher geringes Schädigungsniveau wie z. B. in der Ain 1996, 1998, die anderen Stationen, besonders Eloyes, besitzen ein hohes Schädigungsniveau, wie es auch an Probestellen der Rhone 1998 gefunden wurde (Tail-Moment-Mittelwerte von ca. 20-45) (Devaux et al. 1998; Flammarion et al. 1998).

3.6.5 Relation zu den Biomarkern EROD-Induktion und AChE-Inhibition

Im Biomonitoring-Programm "PNETOX" wurde neben der Gentoxizität in den Blutzellen der Gehalt an Acetylcholinesterase (AChE) im Muskel und die EROD-Aktivität in der Leber gemessen. In der vorliegenden Arbeit sollten die Ergebnisse der AChE- und EROD-Bestimmungen auf mögliche Korrelationen mit der Gentoxizität überprüft werden. Die Parameter wurden nicht durch mich selbst gemessen, gehören jedoch zu den Ergebnissen der Untersuchung, an der ich teilgenommen habe und sind dort zum Teil in einem Projektbericht genannt, teilweise auch im Zusammenhang mit der Folgeuntersuchung 1999 publiziert (Flammarion et al. 1998; Flammarion et al. 2002). Die statistische Bearbeitung dieser Ergebnisdaten wurde jedoch hier zum Teil unabhängig von den genannten Publikationen vorgenommen.

Die zwei (Nicht-Gentoxizitäts-) Biomarker waren im Gegensatz zur Gentoxizität abhängig vom Geschlecht (EROD) bzw. von der Größe der Fische (AChE).

3.6.5.1 AChE-Inhibition

Ziel einer AChE-Bestimmung ist vor allem, eine Belastung mit Pestiziden (Organophosphate und Carbamate) zu überprüfen. Die AChE wird durch solche Stoffe inhibiert.

Die AChE-Aktivität in den Muskeln sank mit steigender Größe der Fische. Flammarion et al. (1998) geben in ihrem Bericht zum Biomonitoring-Programm "PNETOX" folgenden Zusammenhang an:

$$\text{Log(AChE)} = 5,7 - 0,0062 * \text{Größe}$$

$$(r^2 = 0,5; p < 0,001; n = 76).$$

Die AChE-Bestimmung zeigte - nach rechnerischer Berücksichtigung der größenabhängigen Unterschiede - keine signifikanten Unterschiede bei *L. cephalus* zwischen den verschiedenen Stationen an (Flammarion et al. 1998). In Tabelle 27 ist die Höhe der Messwerte wiedergegeben:

Tabelle 27: AChE-Aktivität im Muskel von *L. cephalus* im Biomonitoring-Programm "PENTOX" 1998 nach Stationen und Geschlecht getrennt

		Mittelwert ± Standardabweichung (nmol/min/mg)	Median (nmol/min/mg)
Velle	Weibchen	64,79 ± 41,05	55,65
	Männchen	61,16 ± 18,72	62,33
Igney	Weibchen	86,38 ± 90,50	45,54
	Männchen	119,55 ± 50,77	106,59
Archettes	Weibchen	46,79 ± 28,44	38,44
	Männchen	139,68 ± 58,87	132,79
Eloyes	Weibchen	33,80 ± 24,89	25,11
	Männchen	80,58 ± 27,04	75,52

Eine Bewertung der Höhe der Inhibition hinsichtlich der Umweltbelastung war schwierig, da noch keine Vergleichsdaten für den Döbel vorlagen. Für eine andere im Messprogramm untersuchte Fischart (*Gobio gobio*) war das Inhibitionspotenzial als Ausdruck der Belastung jedoch vergleichsweise gering (Flammarion et al. 1998). Eine Korrelation zwischen Gentoxizität im Comet Assay an Erythrozyten und der AChE-Aktivität im Muskel gab es nicht. Die Daten liefern daher keine Anhaltspunkte für Zusammenhänge zwischen Pestizidbelastung und gentoxischer Wirkung. Da sowohl nicht gentoxische als auch gentoxische Pestizide beschrieben sind, erscheint eine Kombinationsuntersuchung - wie hier geschehen, jedoch sinnvoll und aufschlussreich.

3.6.5.2 EROD-Induktion

Die EROD-Aktivität ist ein Maß für die Induktion von Cytochrom P 450 1A1 (CYP1A1), eines Phase-I-Enzyms der Biotransformation in der Leber. Sie wird vor allem dazu benutzt, eine Belastung durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs), polychlorierte Biphenyle (PCBs) und Dioxine anzuzeigen, da diese Stoffe die CYP1A-Aktivität über den Arylhydrocarbon-Rezeptor induzieren können. Die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Gentoxizität und EROD-Aktivität erscheint sehr sinnvoll, da eine Reihe von Xenobiotika wie die PAHs über CYP1A zu mutagenen Metaboliten umgewandelt werden. CYP1A spielt also eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von zunächst nicht gentoxischen zu gentoxischen Substanzen (DNA-reaktive Metabolite, ultimate Karzinogene).

In den Untersuchungen an den Fischen zeigte sich folgendes Ergebnis: Die EROD-Aktivität war bei den Weibchen geringer als bei den Männchen. Dies ist ein bei vielen Fischarten bekanntes Phänomen in der Fortpflanzungsperiode. Die Daten müssen daher für die Geschlechter getrennt betrachtet werden oder einer Umrechnung unterzogen werden, wie sie beispielsweise von Flammarion & Garric (1999) beschrieben worden ist.

Im Gegensatz zur im Comet Assay gemessenen Gentoxizität, die flussabwärts abnahm, wurde für die EROD-Aktivität flussabwärts eine Zunahme beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 dargestellt:

Tabelle 28: EROD-Aktivität in der Leber von *L. cephalus* im Biomonitoring-Programm "PENTOX" 1998 nach Stationen und Geschlecht getrennt

		Mittelwert \pm Standardabweichung (pmol/min/mg)	Median (pmol/min/mg)	5 %Quantil (pmol/min/ mg)	95 %Quantil (pmol/min/ mg)
Velle	Weibchen	24,82 \pm 17,72	25,20	1,27	50,55
	Männchen	71,68 \pm 36,30	57,20	39,01	141,24
Igney	Weibchen	18,14 \pm 14,50	18,25	1,33	38,57
	Männchen	96,41 \pm 72,15	82,65	22,97	230,19
Archettes	Weibchen	9,45 \pm 7,73	9,05	0,30	19,55
	Männchen	38,18 \pm 19,82	37,95	11,26	67,62
Eloyes	Weibchen	4,34 \pm 5,08	2,25	1,05	14,18
	Männchen	40,31 \pm 24,49	37,55	9,33	81,09

Um die EROD-Daten sinnvoll in Beziehung zu den Comet Assay-Daten zu setzen und später zu diskutieren, soll bereits an dieser Stelle eine kurze Erläuterung zur Interpretation/Bewertung der Daten eingefügt werden: Das Induktionsniveau war in Relation zu anderen Untersuchungen als relativ hoch einzustufen: Es wurden EROD-Werte erreicht, die bis zu zehnfach gegenüber Untersuchungen an *L. cephalus* in den Flüssen Ain, Ardèche und der Drôme erhöht waren (Flammarion et al. 1998), wobei die Werte dieser Flüsse nach den Ergebnissen dieser Autoren als Kontrollwerte beim Döbel zu betrachten sind. Flammarion & Garric (1999) widmeten eine Ihrer Publikationen der

Etablierung von Referenzwerten und der statistischen Bearbeitung und Klassifizierung der EROD-Messungen bei *L. cephalus* und *Gobio gobio*. Nach dieser Klassifikation zunehmender Belastung von 1-5 wurde die in Tabelle 29 gezeigte Einstufung von diesen Autoren vorgenommen:

Tabelle 29: Klassifikation der EROD-Werte von 1-5 (zunehmende Belastung). Aus Flammarion et al. 1998 (zur Methode der Klassifikation s. Flammarion & Garric 1999:

	Weibchen	Männchen	Weibchen und Männchen ^{a)}
Velle	3	5	4
Igney	2	4	4
Archettes	1	3	3
Eloyes	1	3	2

a): Die Berechnungsmethode von Flammarion & Garric (1999) erlaubt einen Abgleich der Unterschiede in der EROD-Aktivität von Männchen und Weibchen, sodass diese direkt verglichen und in einer Gruppe zusammengefasst werden können.

Es gab, bis auf eine Ausnahme, keine signifikanten Korrelationen zwischen den beiden Biomarkern EROD in der Leber und Gentoxizität in Erythrozyten, wenn sie - nach Stationen gruppiert - miteinander verglichen wurden (Tab. 30):

Tabelle 30: Berechnungsergebnisse der Korrelation von EROD-Induktion und DNA-Schaden bei *L. cephalus* im Programm "PNETOX" 1998. Die Signifikanz wurde über eine Pearson Produkt-Moment-Korrelation (Statistikprogramm SigmaStat 2.0, Fa. Jandel Scientific) berechnet. n.s.: Korrelation ist nicht signifikant.

	Anzahl n	Korrelationskoeffizient	p	Signifikanz (p < 0,05)
Alle	72	-0,123	0,303	n.s.
Weibchen, alle Stationen	34	-0,332	0,0551	n.s.
Männchen, alle Stationen	38	-0,195	0,240	n.s.
Velle, beide Geschlechter	18	-0,505	0,0324	signifikant
Igney, beide Geschlechter	19	0,164	0,503	n.s.
Archettes, beide Geschlechter	15	0,133	0,637	n.s.
Eloyes, beide Geschlechter	20	-0,334	0,150	n.s.
Velle, Weibchen	9	-0,440	0,236	n.s.
Igney, Weibchen	9	0,408	0,276	n.s.
Archettes, Weibchen	6	0,202	0,701	n.s.
Eloyes, Weibchen	10	-0,0894	0,806	n.s.
Velle, Männchen	9	-0,360	0,341	n.s.
Igney, Männchen	10	0,153	0,672	n.s.
Archettes, Männchen	9	-0,220	0,569	n.s.
Eloyes, Männchen	10	-0,443	0,200	n.s.

Obwohl kaum signifikante Korrelationen zwischen Gentoxizität in Erythrozyten und EROD-Induktion in der Leber auftraten und sowohl positive als auch negative

Korrelationskoeffizienten resultierten (Tab. 30), fällt im Großen und Ganzen zwischen den Stationen ein gegenläufiger Trend von Gentoxizität und EROD-Induktion auf. Die Gentoxizität nimmt stromabwärts eher ab, während die EROD-Induktion eher zunimmt. Bei getrennter Betrachtung von Männchen und Weibchen wurden ebenfalls gegenläufige Trends der beiden Biomarker - besonders bei den Weibchen - deutlich, wobei dort im Signifikanztest eine zwar geringe Irrtumswahrscheinlichkeit ($p = 0,0551$) erreicht wurde, die jedoch noch über der üblichen Signifikanzgrenze von 0,05 lag. Für die Fische aus Velle-sur-Moselle, wo die EROD-Induktion am höchsten war, ergab sich eine statistisch signifikante negative Korrelation, die aber bei getrennter Betrachtung der Geschlechter (und diese ist wohl angebracht) wieder verschwand.

Ein einfacher biologischer Zusammenhang zwischen EROD-Aktivität und Gentoxizität, der zudem für alle Stationen gilt, konnte hier also nicht gefunden werden, aber sofern ein solcher Zusammenhang existiert, ist eine negative Korrelation wahrscheinlicher als eine positive, weil die oben angestellten statistischen Berechnungen häufiger auf eine solche hinweisen. Dabei ist hier natürlich zu beachten, dass die beiden Biomarker an unterschiedlichen Organen bzw. Zelltypen - im Blut und in der Leber - gemessen wurden (siehe Diskussionsteil).

3.6.6 Chemische Analytik

Im Programm "PNETOX" wurde eine chemische Begleitanalytik von Sediment- und Muskelproben der Fische durchgeführt (Analysen des Centre d'Analyse et de Recherche de l'Université de Strasbourg siehe **Anhang 4**). Um festzustellen, ob zwischen den Werten (z. B. Gentoxizitätsdaten und Substanzkonzentrationen) Zusammenhänge feststellbar sind, wurden jeweils die Korrelationskoeffizienten errechnet (Pearson Product Moment Correlation; Software: SigmaStat 2.0, Fa. Jandel Scientific). Es wurde also ein möglicher *linearer* Zusammenhang zwischen den Messwerten der Probenahmestellen untersucht, wobei für jede Korrelation nur 4 Messwertpaare vorhanden waren, nämlich für jede Station eines. Auch im Falle der Analyse der Muskeln lagen für jede Station nur die Werte gepoolter Proben vor. Der Stichprobenumfang für jede Korrelation war also klein, was die Herstellung signifikanter Ergebnisse erschwerte.

Es war zunächst festzustellen, dass die Substanzkonzentrationen in den Muskeln der Fische zu den Konzentrationen der selben Substanz im Sediment keinerlei signifikante lineare Korrelation aufwiesen. Dies gilt sowohl für die Schwermetalle als auch für die organischen Substanzen. Für Cu beispielsweise beträgt der Korrelationskoeffizient $r = 0,149$ bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,851$. Zur Erklärung: Erst ab $p \leq 0,05$ wäre eine Korrelation statistisch signifikant. Für Pb betragen die Werte $r = -0,0628$ und $p = 0,937$. Bei den untersuchten polychlorierten Organika wurden nur die polychlorierten Biphenyle (PCB) sowohl im Sediment als auch im Muskel chemisch analysiert. Jedoch auch bei den PCBs ergab sich keine (lineare) Korrelation zwischen den Konzentrationen in Muskel und Sediment. Zum Beispiel waren die Korrelationswerte für die Summe der PCBs $r = 0,298$ mit $p = 0,702$.

Plausibel, aber nicht besonders erkenntnissteigernd war, dass die Gehalte verschiedener PCBs im Muskel selbst miteinander deutlich positiv korrelierten (also je mehr HCB im Muskel, desto größer war dort auch die Konzentration von PCB 153 und die Summe der

PCBs). Die Werte waren die folgenden: HCB zu PCB 153: $r = 0,994$; $p = 0,00613$; HCB zu Summe PCBs: $r = 0,981$; $p = 0,0195$; PCB 153 zu Summe PCBs: $r = 0,975$; $p = 0,0253$.

Die Konzentrationen der Organochlor-Pestizide Lindan (Hexachlorcyclohexan) und DDE (Dichlordiphenyldichlorethan, ein Abbauprodukt des DDT) in den Fischmuskeln waren nicht signifikant mit den anderen Substanzkonzentrationen korreliert. Daten für eine Gegenüberstellung der gleichen Pestizide in Muskeln und Sediment waren leider nicht vorhanden. Es ergab sich höchstens eine positive "Fast-Korrelation" von Lindan in den Fischmuskeln und PAHs in den Sedimenten. Aber auch eine biologische Signifikanz wäre hier wohl nicht nachvollziehbar. Der Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff (TOC) im Sediment war ebenfalls nicht mit den anderen organischen Kontaminationen korrelierbar.

Auch für die Gentoxizität im Comet Assay (Tail Moments) ließ sich keinerlei positive Korrelation mit den Metallgehalten in Muskeln oder Sedimenten feststellen. Manchmal ergab sich sogar ein eher gegenläufiger Anschein, aber auch eine negative Korrelation war statistisch nicht festzustellen. Z. B. zeigten die Schwermetallbestimmungen im Sediment (aber nicht in den Fischmuskeln) vor allem in Bezug auf den Bleigehalt, aber auch bei Cr, Ni, Zn und Cu bei Velle-sur-Moselle die stärkste Kontamination (s. Anhang 4). Dennoch wurde in Velle-sur-Moselle eine eher niedrige gentoxische Schädigung gefunden.

Bei der Frage der Korrelation der organischen Verunreinigungen mit der Gentoxizität konnte Folgendes festgestellt werden: Zu den PAHs im Sediment, die ja als gentoxisch verdächtig erscheinen, ließ sich kein Zusammenhang herstellen: $r = 0,167$; $p = 0,833$. PAHs waren im Sediment von Archettes am stärksten vertreten (s. Anhang 4). In den Muskeln wurden PAHs nicht untersucht. Für Lindan und DDE konnte auch keine Korrelation mit Gentoxizität festgestellt werden.

Die einzige Korrelation mit den Gentoxizitätsdaten ergab sich für die Konzentrationen der PCBs in den Muskeln der Fische, die bei den drei stärker im Comet Assay reagierenden Stationen ca. 2-3-fach höher als in Velle-sur-Moselle waren. Die Korrelation galt für alle PCB-Werte, wobei sie am stärksten bei HCB hervortrat: $r = 0,977$; $p = 0,0229$. Interessanterweise bestand - wie oben gesagt - keinerlei Zusammenhang zwischen PCBs in den Muskeln und PCBs im Sediment. So hatte auch die auffällig erhöhte PCB-Konzentration im Sediment von Igney (s. Anhang 4) keine Entsprechung in den Konzentrationen im Muskel oder der Gentoxizität.

Die als Cytochrom P450- bzw. EROD-Induktoren bekannten PCBs riefen offenbar keine entsprechenden Steigerungen bei den gemessenen EROD-Werten hervor. Im Gegenteil, sie waren eher leicht gegenläufig (aber ohne dass eine negative Korrelation signifikant gewesen wäre).

Die Daten zeigten also kaum Hinweise auf Zusammenhänge der Effekte bei den Biomarkern mit dem Vorhandensein einzelner analysierter Kontaminanten. Auch die Biomarker untereinander korrelierten kaum (s. Kapitel 3.6.5.2). Zu den Interpretationen siehe Diskussionsteil (4.4).

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Anwendung des Comet Assay an Fischzellen. Da auf diesem Gebiet noch relativ wenige Untersuchungen vorlagen, war eine Übertragung des bisher hauptsächlich an Säugerzellen angewandten Tests auf Fischzellen von Interesse. Damit nahm die Untersuchung einiger methodischer und mechanistischer Fragestellungen und die grundlegende Datenerhebung und -verarbeitung großen Raum ein. Sekundäres Gewicht hatte die Untersuchung einiger zellbiologischer Faktoren, die einen unmittelbaren Einfluss auf die Testdurchführung haben. Die Zielstellung, das Testsystem zukünftig zur Untersuchung von gentoxischen Belastungssituationen, besonders von Fischen, in Gewässern anzuwenden, war übergeordnet und wurde an einigen Proben bzw. Fischzellen in dieser Form erstmalig durchgeführt. Anhand der Ergebnisse und des Vergleichs mit der bisher bekannten Literatur sollte eine Einschätzung getroffen werden, ob der Comet Assay ein geeigneter Gentoxizitätstest ist. Dazu in Zukunft noch notwendige sowie interessante weiterführende Untersuchungen sollten benannt werden.

4.1 Übertragung und Anpassung des Comet Assay-Protokolls auf Fischzelllinien *in vitro* - technisch-methodische Parameter

4.1.1 Die methodischen Parameter im Comet Assay an Fischzellen *in vitro*

Die Faktoren, die das Ergebnis des Comet Assay beeinflussen können, sind sehr vielfältig und in neueren Untersuchungen stellte sich oft heraus, dass bestimmte Faktoren bisher zu wenig Beachtung fanden (siehe z. B. Speit et al. 1999) oder bei der Anwendung an speziellen Organismen wesentlich größeren Einfluss als bei den meisten anderen bisher untersuchten besitzen (z. B. Erbes et al. 1997 ; Singh et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde nur eine kleine Auswahl an Faktoren untersucht und in Übertragung des alkalischen Comet Assay, wie er von Singh et al. (1988) an röntgenbestrahlten menschlichen Lymphozyten angewandt wurde, geändert. In Tabelle 31 ist eine größere Anzahl von Faktoren aufgelistet, die das Testergebnis beeinflussen können:

Tabelle 31: Beispiele wichtiger Faktoren, die das Ergebnis des Comet Assay beeinflussen

<u>Faktoren, die auf die lebenden Zellen einwirken</u>	<u>Faktoren, die auf die DNA-Nukleotide im Gel einwirken</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Zelltyp: Metabolismus/ Biotransformationskapazität • Zelltyp: DNA-Reparaturkapazität • Zellkultur: Phase des Zellzyklus • Zellkultur: Zelldichte • Zellkultur: Zellkulturmedien • Exposition: Substanzspezifität: Je nach Wirkmechanismus Varianz der DNA-Schädigung, Einfluss auf Varianz zwischen den Einzelzellen, Kometenform u.a. • Exposition: Lösungsvermittler • Exposition: Temperatur • Exposition: Dauer • Exposition: Konzentration/Dosis • Exposition: Partikel/Inhomogenität/Unlöslichkeit der Probe • Exposition: Gemischtoxizität • Bearbeitung nach Exposition: Temperatur, Dauer • Trypsinierung: Temperatur, Dauer • Lyse • weitere Faktoren 	<ul style="list-style-type: none"> • pH-Wert (Alkalinität) • DNA-Entwindungsdauer • Elektrophorese: Dauer, Elektrisches Potenzial, Puffer, Art der Elektrophoresekammer/ Elektrisches Feld, Position des Objektträgers u.a. • Lichteinwirkung • Temperatur • Agarose: Konzentration u.a. • DNA-Farbstoff
	<u>Faktoren der Bearbeitung im Labor und Datenverarbeitung</u> <ul style="list-style-type: none"> • Pipettiergenauigkeit • Genauigkeit der Stammlösung • Bildanalyse: Systemparameter • Bildanalyse: Einflüsse des Programms • Bildanalyse: subjektive Einflüsse (Auswerter) • Fluoreszenzmikroskopie: Art und Aufbewahrung der Objektträger • Fluoreszenzmikroskopie: Hintergrundfluoreszenz, Optik und weitere Faktoren • Statistische Methodik

Eine mögliche Einteilung ist die in abiotische und biotische Faktoren. Die abiotischen physikalischen und chemischen Faktoren des Assay-Protokolls bei der Versuchsdurchführung im Labor sind die "Assay-Parameter" im klassischen Sinne. Vielleicht hilft es hier, den Begriff "Comet Assay" nochmals als "Einzelzell-Gelelektrophorese" zu übersetzen, damit die Eingrenzung auf eine aus wenigen Schritten bestehende Labormethode deutlich wird, welche die Zellkulturfaktoren u.ä. *nicht* beinhaltet. Ein großer Teil dieser Faktoren konnte in der vorliegenden Arbeit vom Protokoll von Singh et al. (1988) übernommen werden. Die meisten der an den physikochemischen Faktoren durchgeführten Änderungen bzw. Untersuchungen - z. B. bei der Elektrophoresedauer, Verwendung vorbeschichteter, getrockneter, nicht aufgerauhter Objektträger, Einfluss der Bildanalyse-Auswertungsparameter - konnten zwar nicht immer unmittelbar mit Ergebnissen an Säugerzellen verglichen werden, jedoch ist die Einschätzung (des Autors) hier, dass eine Änderung dieser - eben abiotischen - Parameter im Prinzip bei Säugerzellen ähnliche Auswirkungen auf Sensitivität und Praktikabilität wie bei Fischzellen und anderen Wirbeltierzellen hat. Der Hauptfehler dieser Einschätzung ist, dass nach allgemeiner Erkenntnis die Zellmembranen, Zellkerne und DNA der Wirbeltiere ähnlich aufgebaut sind und sich daher in der Lyse, alkalischen Entwindung und Elektrophorese grundsätzlich ähnlich verhalten (weiter unten wird dies durch Literaturvergleich mit Comet Assay-Ergebnissen anderer Autoren bestätigt). Diese "abiotischen" Parameter werden daher hier eher als allgemeine Comet Assay-Parameter diskutiert. Sie wurden zum Teil gegenüber dem Protokoll von Singh et al. (1988) verändert, um die Methode z. B. im Hinblick auf Praktikabilität und Sensitivität zu optimieren. Spezifisch für die Fischzelltypen sind diese grundlegenden Parameter jedoch wahrscheinlich nicht - sie könnten also ebenso gut zur Optimierung eines Säugerzell-Assays mit ähnlichen Zielen verändert werden. Konkret

heißt das, dass eine Erhöhung der Elektrophoresezeit vermutlich auch bei Säugerzellen eine Sensitivitätssteigerung bringt, und dass getrocknete Gele auf den Objektträgern vermutlich auch bei Säugerzellen eine verbesserte Praktikabilität erbringen.

Erst wenn man den Test im weiteren Sinne betrachtet und die Vorbereitungsschritte, d. h. mit der Zellkultur und Inkubation/Exposition zusammenhängende Arbeitsschritte mit einbezieht, kommt man auf relevante biologische Unterschiede zwischen verschiedenen Wirbeltierzellen. Eine methodische Anpassung des Comet Assay als "Einzelzell-Gelelektrophorese" an Unterschiede in den lebenden Zellen kann strenggenommen gar nicht stattfinden, weil der Comet Assay eigentlich erst mit der Abtötung der Zellen durch die Lyse der Membranen mit Detergenzien beginnt. Was nun aber die "Vorbereitungsschritte" an den lebenden Zellen, also den Comet Assay in einem weiteren Sinne betrifft, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Schritte unternommen, die als fischzellspezifisch angesehen werden können: Es wurden die Zellkulturbedingungen gewählt, die den Lebensbedürfnissen von Fischzellen entsprechen. Die Zellen wurden im Hinblick auf ihre DNA-Schädigungs- und Reparaturkinetiken untersucht, und Versuche zum Metabolismus und zur DNA-Reparatur wurden durchgeführt. Eine Anpassung des Comet Assay fand in der Hinsicht statt, dass in den Folgeversuchen die als optimal gefundenen Bedingungen hergestellt wurden. Weiterhin wurde die DNA-Schädigung bei den Fischzellen in Abhängigkeit von Schadstoff und Dosis untersucht und dabei eine geeignete Positivkontrolle ausgewählt. Andere möglicherweise fischzellspezifische Anpassungen wurden nicht vorgenommen, weil es entweder nicht notwendig war (beispielsweise erfordert eine spezifische Kometenform keine grundlegende Änderung der Vermessungsmethode) oder weil die Aspekte nicht näher untersucht wurden (z. B. Schadstoffaufnahme der Zellen). Einige offene Fragen ließen sich wohl auch nur durch direkte Vergleichsversuche - und nicht durch bloßen Literaturvergleich - klären (z. B. der Einfluss der organismenspezifischen DNA-Menge bzw. Chromosomenzahl).

4.1.2 Funktionsprinzip der DNA-Migration im Comet Assay

Zunächst sollen hier die Technik und die Grundprinzipien des Comet Assay anhand der Literatur beleuchtet werden, um den in der Einleitung (Kap. 1.4) gegebenen Überblick zu erweitern und die Funktionen bzw. Einflüsse der methodischen Parameter zu verdeutlichen. Zwei der in dieser Arbeit experimentell bzw. statistisch untersuchten methodischen Testparameter waren Elektrophoresedauer und Bildanalyse-Parameter. Aber im Rahmen der Einführung und Optimierung wurden gegenüber dem ursprünglichen Protokoll auch mehrere Parameter gleichzeitig verändert bzw. nicht eingehender untersucht, sodass eine etwas umfassendere Beschreibung sinnvoll erscheint. Beispiele für diese Parameter und Veränderungen sind: Bauart und Abmessungen der Elektrophoresekammer, Verwendung von klaren statt aufgerauhten Objektträgern mit einer Schicht getrockneter Agarose, Temperatur bei Lyse und Elektrophorese .

Die Entstehung der DNA-"Kometen" und die Gesetzmäßigkeiten in der alkalischen Einzelzell-Gelelektrophorese sind noch nicht vollkommen aufgeklärt. Die Grundprinzipien sind in Abb. 1 und in der Einleitung (Kap. 1.4) dargestellt. Im Lyseschritt wird die DNA zunächst weitgehend von den übrigen Zellbestandteilen befreit. Die Detergenzien Triton X-100 und Natriumlaurylsarcosinat permeabilisieren die

Plasmamembran, und die hohe Salzkonzentration bewirkt die Entfernung von Proteinen und RNA. Durch eine Behandlung mit Proteinase K bzw. Ribonuklease konnten andere Autoren bei Humanlymphozyten eine weitere Effektsteigerung erreichen (Singh & Stephens (1997), was darauf hindeutet, dass die DNA ohne diese Behandlung noch solche Bestandteile enthalten kann und dass hier vielleicht zelltypspezifische Unterschiede auftreten könnten. Im alkalischen Milieu des Elektrophoresepuffers werden dann die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelstränge gelockert bzw. getrennt (DNA-Denaturierung), und es kann eine Entspannung der aufgewundenen und verknäulten DNA stattfinden (Verlust der Tertiär- und Quartärstruktur der DNA). Wie bei einem Wollknäuel, in das Einschnitte gemacht werden, ist die Relaxation und die Beweglichkeit in der folgenden Elektrophorese um so größer, je mehr Strangbrüche in der DNA vorhanden sind: Relaxed Coil- bzw. Relaxed Loops-Modelle (Klaude et al. 1996, Collins et al. 1997). Nach der gebräuchlichen generellen Erklärung für die DNA-Elektrophorese wandert die DNA im elektrischen Feld in Richtung der Anode, weil sie negative Ladungen trägt (mehr zur Elektrophorese siehe unten). Während in der alkalischen Version des Comet Assay Einzel- *und* Doppelstrangbrüche (SSBs = Single Strand Breaks und DSBs = Double Strand Breaks) angezeigt werden, geht man davon aus, dass sich Einzelstrangbrüche in der neutralen Version des Comet Assay nicht auswirken, weil die DNA-Einzelstränge nicht getrennt werden, die DNA also trotz SSBs immer noch durch den Komplementärstrang zusammengehalten wird. Klaude et al. (1996) zeigten, dass vor allem bei der Neutralversion des Comet Assay die Schweif-DNA mit der Kopf-DNA bei der Elektrophorese verbunden bleibt, und Singh & Stephens (1997) vermuteten, dass die zusammenhängenden Stränge jeweils einzelne Chromosomen darstellen. Aber auch vom alkalischen Comet Assay wird über eine Zunahme der DNA-Menge im Schweif bei zunehmender Schädigung berichtet, ohne dass die Länge des Schweifs zunimmt, was ja im Vergleich zur konventionellen DNA-Elektrophorese überrascht (siehe auch Ergebnisse zu den Bildanalyseparametern Tail DNA und Tail Length, vorliegende Arbeit 3.1.3 u. 4.1.3.3). Im mikroskopischen Bild kann auch *keine* regelmäßige Trennung von großen Fragmenten am Vorderende (proximal, zum Kometenkopf gerichtet) und kleinen Fragmenten am Hinterende (distal) des Schweifs festgestellt werden, m.a.W. es besteht offenbar kein Zusammenhang zwischen Migrationsstrecke und Fragmentgröße (Hellman et al. 1995), oder die Fragmente können eben nicht frei wandern. Dennoch scheint die DNA-Migration eines "Comets" der alkalischen Elektrophorese eine Funktion vieler Variablen zu sein: Die DNA wird nicht nur gestreckt, sondern es können auch einzelne Fragmente frei aus dem Nukleoid (dem ehemaligen Zellkern) herauswandern - vor allem bei stärkerer DNA-Schädigung. So erklärt man sich die teilweise vorkommende Trennung von Kopf- und Schweifregion und das diffuse "Verschwinden" von übermäßig stark geschädigten Comets (Klaude et al. 1996).

Der alkalische Comet Assay zeigt außerdem alkali-labile Stellen an: Einige DNA-Basenveränderungen, z. B. bestimmte Addukte, sind alkali-labil: die Basen gehen im alkalischen Entwindungs-/Elektrophoresepuffer aus dem DNA-Strang verloren (AP-Stellen, apurinische/apyrimidinische Stellen), sodass SSBs zurückbleiben. Diese addieren sich also zu bereits vorhandenen Strangbrüchen: Miyamae et al. (1997) wiesen den Unterschied zwischen einem Anteil von vermutlich bereits bestehenden SSBs nach Alkali-Behandlung bei pH 12,1 gegenüber einem größeren Gesamtanteil, der auch alkali-labile Stellen einschließt, bei pH 12,6 nach. Durch besonders lange Alkali-Behandlung

(8-18 h) kann die Anzahl von Strangbrüchen übermäßig gesteigert werden, sodass eine sinnvolle Auswertung dann unmöglich wird, und offenbar kein Zusammenhang mehr zwischen gentoxischer Schädigung und Testergebnis besteht (Yendle et al. 1997). Die alkalische Entwindung der DNA-Struktur beginnt ungefähr bei pH 11,7 (Singh 2001, persönl. Mitteilung..

4.1.3 Untersuchte Einzelparameter

4.1.3.1 Elektrophoresedauer

In Bezug auf den Einsatz des Comet Assay als Biotest bieten sich Elektrophoreseparameter dazu an, mit geringem Aufwand eine Optimierung, z. B. eine Sensitivitätssteigerung des Tests zu bewirken. Dieses Ziel wurde hier erreicht: durch Erhöhung der Elektrophoresedauer von 20 auf 35 min erhöhte sich die Steigung der NQO-Dosis-Wirkungs-Kurven überproportional (Zeitsteigerung 1,75-fach, resultierende Erhöhung der Steigung 2,6-fach). D. h., dass vor allem die Auflösung (Differenz der Reaktion zwischen zwei Konzentrationspunkten) deutlich größer wurde, und in geringem Maße auch die Sensitivität. Dieses Ergebnis an Fischzelllinien entsprach im Allgemeinen der Erwartung, die man auch für Säugerzellen gehabt hätte:

Auch andere Autoren erwähnen oft nicht besonders genau beschriebene Vergleichsversuche zum Effekt verschiedener Elektrophoresezeiten im Comet Assay, oft im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Dauer der alkalischen Denaturierung. Bei Vijayalaxmi et al. (1992) wurden die Elektrophoresezeiten 20 u. 40 min an γ -bestrahlten Humanlymphozyten verglichen, und eine "direkte Abhängigkeit" gefunden (die Ergebnisse stehen in Einklang mit den hier beschriebenen); Singh & Stephens (1997) dehnten die Elektrophoresedauer bei röntgenbestrahlten Humanlymphozyten von 20 min auf 1 bzw. 2 h aus und fanden eine "Steigerung der Unterschiede von Kontrolle zu Probe"; bei Klaude et al. 1996 und Floyd & Cassoni (1994) wurde auch eine Abhängigkeit von der Elektrophoresespannung gefunden, der Effekt nimmt mit höherer Spannung zu, allerdings darf sie nicht zu sehr gesteigert werden. Letztere Autoren fanden an Humanlymphozyten ein Optimum bei 40 min Elektrophorese-Dauer; 1 V/cm; pH 13 (getestete Spannungen: 0,6-5 V/cm).

Da beim Comet Assay noch generell Unklarheiten in Bezug auf die Prinzipien und die Vorgänge bei der Elektrophorese bestehen, wird dieses Funktionsprinzip im Folgenden ausführlicher diskutiert. Hierbei ist vor allem auch der Vergleich mit der konventionellen, "makroskopischen" Elektrophorese (um sie begrifflich von der mikroskopisch gemessenen Elektrophorese des Comet Assay zu unterscheiden) wichtig, da deren Gesetzmäßigkeiten besser bekannt sind.

Das Prinzip von DNA-Elektrophoresen beruht darauf, dass jedes DNA-Nukleotid im DNA-Strang an seiner Phosphatgruppe eine negative Ladung trägt und die DNA daher im elektrischen Feld in Richtung der Anode wandert (Alberts et al. 1994). In Elektrophoresen - ob von DNA oder Proteinen - erfolgt eine Auftrennung hauptsächlich nach Ladung und Molekülgröße. Da DNA-Moleküle aber relativ gleichmäßig bzw. konstant von negativer Ladung umgeben sind, zeigt sich ein ähnlicher Effekt wie bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen: Die Auftrennung erfolgt fast

ausschließlich nach der Fragmentgröße und kaum nach der Anzahl der Ladungen. Bei "makroskopischer" Elektrophorese von DNA-Molekülen geht man also von konstanten Geschwindigkeiten gleich großer Moleküle bzw. Fragmente aus, und die Migrationsstrecke bzw. -geschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentgröße ($v \sim 1/(\log_{10}(L))$) (Sambrook et al. 1989, Sealy & Southern 1990) oder auch einfach zur Fragmentgröße ($v \sim 1/L$) (Sealy & Southern 1990). Das Gel hat bei der Elektrophorese eine Art Siebeffekt und erzeugt einen Widerstand gegen die Wanderung, wobei der Widerstand mit der DNA-Molekülgröße steigt, aber auch z. B. von der Konformation abhängt.

Gering konzentrierte Agarosegele und niedrige Elektrophoresespannungen werden in der konventionellen DNA-Elektrophorese dazu verwendet, um relativ große DNA-Fragmente zu trennen. Im Comet Assay soll ja schon ein Nachweis einer geringen Anzahl von Strangbrüchen möglich werden. Da mit diesem Test wenige Tausend Strangbrüche pro Zelle detektiert werden können, würde dies etwa riesigen Fragmenten von ca. 10^9 Da entsprechen (Collins et al. 1997). Die mikroskopische Einzelzell-DNA bildet jedoch keine abgegrenzten Banden, wie für die "makroskopische" Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten typisch. Vielleicht kann eine Bandenbildung jedoch allein schon aufgrund des geringen Auflösungsvermögens von Agarosegelen (Sambrook et al. 1989) und einer relativ zufälligen Verteilung von Strangbrüchen nicht erwartet werden, und schon gar nicht im mikroskopischen Bereich mit der DNA-Menge jeweils nur einer Zelle. Theodorakis et al. 1994 führten eine makroskopische Mehrzell-Elektrophorese, die methodisch dem Comet Assay ähnelt, mit DNA aus Fischblutzellen durch: Auch dort wurde keine Trennung in Banden erreicht. Die Wanderung von DNA-Einzelsträngen hängt außerdem auch von der DNA-Sekundärstruktur ab (Sealy & Southern 1990), es spielen also durchaus weitere Faktoren neben dem Molekulargewicht eine Rolle. Besonders auch im Vergleich mit anderen Methoden, bei denen eine zeitabhängige, alkalische Entwindung von Doppelstrang- (ds-) DNA in Einzelstrang (ss-) DNA stattfindet, zeigt sich, dass bei den üblichen eher kurzen Zeiten der alkalischen Entwindung im Comet Assay (hier 45 min) die DNA noch nicht vollständig entwunden ist und somit ein Teil der DNA noch aneinanderhängt. Hinzu kommt, dass bei Anwendung des "normalen" Comet Assay-Protokolls (ohne Proteinase K) tatsächlich noch Kernproteine vorhanden sind. Somit gelten die Regeln der "normalen" DNA-Elektrophorese (freie Wanderung von DNA-Fragmenten) nur für einen distalen Teil des Kometenschweifes, während ein großer Teil DNA im Kometenkopf und dem proximalen Teil des Schweifes sich anders verhält (Singh 2000 und Singh 2001, persönl. Mitteilung). Darüber hinaus ist es offenbar sogar für die Funktionalität des Comet Assay notwendig, dass Verbindungen der DNA bestehen bleiben, ansonsten werden die "Comets" diffus und unauswertbar (Singh 2001, persönl. Mitteilung).

Die Dauer der alkalischen Entwindung im Elektrophoresepuffer ist also neben der Elektrophoresezeit selbst von entscheidender Bedeutung. Die Dauer der Lyse (bei pH 10) hat dagegen keinen merklichen Effekt auf die DNA-Migration (eigene Beobachtungen und Jendle et al. 1997: Mauskeratinozyten), weil sie wohl schon nach sehr kurzer Zeit vollständig abgeschlossen ist. Bei anderen Zelltypen, besonders bei speziell beschaffener Zellmembran bzw. Zellwand, hat sich die Lysedauer aber als wichtigerer Faktor erwiesen (z. B. bei *Chlamydomonas reinhardtii*: Erbes et al. 1997).

4.1.3.2 Schlussfolgerungen zur Elektrophoresedauer

Eine Erhöhung der Elektrophoresedauer ist gut geeignet, die Auflösung im Comet Assay zu erhöhen. Die absolute Sensitivität steigt dagegen nur wenig. Dieser Zusammenhang gilt wohl allgemein und ist nicht auf die untersuchten Zelltypen beschränkt (s.u.).

Der Comet Assay ist nur bedingt mit einer konventionellen DNA-Elektrophorese vergleichbar. Entscheidende Unterschiede liegen zum Beispiel in den DNA-Fragmentgrößen, den Wanderungsstrecken (mikroskopisch klein beim Comet Assay), der vermutlich unvollständigen Strangtrennung beim Comet Assay und der Reinheit und Struktur der DNA. Dennoch steht das Ergebnis der überproportional starken Erhöhung der Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurven durch Verlängerung der Elektrophoresezeit weitgehend in Übereinstimmung mit den Erwartungen, die sich aus der konventionellen DNA-Elektrophorese ableiten lassen.

Setzt man voraus, dass eine bestimmte, konstante DNA-Schädigung stattgefunden hat, so sind zelltypspezifische Unterschiede im Comet Assay wohl vor allem dann zu erwarten, wenn sich die Beschaffenheit der Zellmembran und des Zellcortex der getesteten Zellen unterscheidet, denn diese Zellelemente sind Hindernisse für die Lyse der Zellen. Zwischen Fisch- und Säugerzellen bestehen daher diesbezüglich keine merklichen Unterschiede. Vermutlich wirkt sich auch die DNA-Menge (Chromosomenzahl) auf das Ergebnis aus. Weiterhin könnten Unterschiede durch die Beschaffenheit der nach Lyse und Entwindung noch verbleibenden Kernelemente hervorgerufen werden. Die Lysebedingungen sind aber wahrscheinlich sowohl für Fischzellkulturen als auch z. B. für Humanlymphozyten so extrem, dass in Bezug auf die Lyse wohl kein bedeutender Unterschied zwischen diesen Zelltypen zu erwarten ist. Ein Unterschied in der DNA-Wanderung aufgrund von Unterschieden der nukleären Proteine und Molekülkonformationen erscheint möglich. Vermutlich wäre ein solcher Unterschied nur im direkten praktischen Vergleich zu erforschen, ein Literaturvergleich erscheint als nicht ausreichend, um darüber Aussagen zu treffen.

Für den optimalen Einsatz im Biotest sollte also für jeden Zelltyp eine Anpassung der DNA-Entwindungs- und Elektrophoresedauer vorgenommen werden, wobei eine genaue Untersuchung der beeinflussenden Faktoren noch aussteht. Je nach gentoxischem Potenzial der Proben (unter der Voraussetzung, dass keine Zytotoxizität auftritt) könnte die Sensitivität des Tests über die Elektrophoresedauer reguliert werden. Obwohl es naheliegender erscheint, bei zu starker Reaktion die Proben zu verdünnen, könnte eine Regulation über die Elektrophoresedauer in einigen Fällen sinnvoll sein. Interessant wäre hierbei zum Beispiel, ob sich dadurch Fehlerquellen ausschließen lassen, die bei einer Verdünnung (Messfehler) zwangsläufig auftreten.

4.1.3.3 Bildanalyse: Vergleich unterschiedlicher Parameter

Von den unterschiedlichen Möglichkeiten der fluoreszenzmikroskopischen Bildauswertung wurden in der vorliegenden Arbeit die Bildanalyseparameter "*Tail Moment*", "*Tail Length*" und "*Tail DNA*" benutzt. Die drei Parameter wurden an RTG-2-Zellen mit dem Ziel beschrieben und verglichen, deren mögliche Vor- und Nachteile zu

ergründen sowie um ggf. Besonderheiten des RTG-2-Testsystems gegenüber den in der Literatur beschriebenen Testsystemen herauszustellen.

Die drei genannten Parameter werden von Anwendern des Comet Assay am häufigsten ausgewählt. Tail Length und Tail DNA (der DNA-Anteil im Schweif in Prozent, bezogen auf den gesamten "Comet") sind Basisparameter, während sich das Tail Moment rechnerisch aus diesen beiden Parametern zusammensetzt ($\text{Tail Moment} = \text{Tail Length} * \text{Tail DNA}$). Grundsätzlich ist zu beachten, dass für die gleichen Bildanalyseparameter (vor allem für das Tail Moment) mehrere unterschiedliche Definitionen existieren (s.u.), sodass Formeldefinition und Berechnungsprogramm immer genannt werden sollten, um Vergleiche zu ermöglichen (hier: Bildanalyzesystem KOMET 3.0, siehe 2.4).

Folgende Unterschiede konnten festgestellt werden: Für den Parameter Tail Length ergab sich eine leicht höhere Sensitivität als bei den anderen Parametern, und das Tail Moment war wiederum etwas sensitiver als die Tail DNA. Die Datenmenge und der getestete niedrige Konzentrationsbereich reicht zwar nicht aus, um diese Aussage statistisch sicher zu belegen, aber für diese Reihenfolge der Sensitivität sprechen weitere Argumente: Beispielsweise wurden die drei Parameter für alle Wasserproben des Gentoxizitätsprojekts (s. 2.7.2 und 3.5.1), also für 135 Versuche, miteinander verglichen. Dabei ergab sich, dass bei Verwendung des Parameters Tail Length etwas mehr Wasserproben als positiv gewertet wurden (63 Proben), als mit dem Tail Moment (59 Proben) und noch weniger waren es mit der Tail DNA (48 Proben) (Daten gezeigt in Nehls & Segner 2005). Weiterhin sprechen sowohl die Form der Dosis-Wirkungs-Kurven als auch Schlussfolgerungen und der Literaturvergleich für die Aussage: Bei der Tail Length ergab sich ein besonders steiler Anstieg im unteren Dosisbereich, während die Tail DNA insgesamt eher einen linearen Verlauf zeigte und bei niedrigen Konzentrationen zunächst nicht anzusprechen schien. Eine logische Erklärung für dieses Verhalten könnte sein, dass sich auch bei geringen Dosen wenige "kleine" DNA-Fragmente vom Kometenkopf lösen konnten (verursacht durch einen oder wenige Strangbrüche) und dann schon eine relativ große Wanderungsstrecke zurücklegen konnten. Solche kleinen Bruchstücke waren auch mikroskopisch sichtbar (in molekularbiologischen Dimensionen gesehen handelt es sich dabei um sehr große DNA- oder Chromatinklumpen). Der prozentuale Anteil am Schweif fiel dagegen kaum ins Gewicht. Dem Vorteil der höheren Sensitivität der Tail Length stand jedoch gegenüber, dass bei ansteigenden Konzentrationen die Steigung eher abnahm und eher ein Maximum erreicht wurde, als bei der Tail DNA. Hierfür könnten zwei Gründe angeführt werden: 1) Bei hoher DNA-Schädigung wandern sehr kleine Fragmente aus dem Schweif heraus und verteilen sich so diffus, dass sie mikroskopisch nicht mehr erkennbar sind (das Schweifende wurde vom Auswerter festgelegt); 2) einige DNA- und/oder Chromatinstücke sind immer noch mit dem Kometenkopf verbunden und werden so an einer weiteren Wanderung gehindert. Die Tail DNA bot dagegen eine bessere Auflösung (s. 3.4.2.1) über einen größeren Dosisbereich als die Tail Length. Wenn Letztere bereits ihr Maximum erreicht hatte, nahm die Tail DNA noch weiter zu.

Ein Sättigungseffekt der Tail Length mit zunehmender Konzentration (Strangbruchrate) gegenüber weiter ansteigender Tail DNA wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Gedik et al. 1992, Kent et al. 1995, Fairbairn et al. 1995, Bauer et al. 1998). Ashby et al. 1995 beschrieben eine (ebenfalls) unvollständige Korrelation.

Kommt es also ausschließlich auf höchste Sensitivität an, ist am ehesten die Tail Length zu empfehlen. Bei hohen Konzentrationen besteht allerdings die Gefahr, dass die Gentoxizität anhand der Tail Length nicht richtig aufgelöst wird. Nachteilig könnte - neben diesem Sättigungseffekt - eine "Anfälligkeit" gegenüber unterschiedlichen Kometen-Morphologien, DNA-Verteilung und Fragmentierungsgrad des Schweifs sein (substanzspezifische Effekte werden z. B. bei McKelvey-Martin et al. 1993 und bei Kuchenmeister et al. 1998 beschrieben, Ashby et al. 1995 weisen auf unterschiedliche DNA-Fragmentierung hin).

Die oben genannten Eigenschaften des Tail DNA-Parameters ließen in der vorliegenden Arbeit zunächst keine weiteren praktischen Vorteile erkennen. Jedoch sollte wohl deutlich gemacht werden, dass die Tail DNA derjenige Parameter ist, der vom Prinzip her am ehesten proportional zu der Anzahl der Strangbrüche ansteigt. Diese biologische Signifikanz wurde bisher selten deutlich als Vorteil benannt (De Boeck et al. 2000), es findet sich nur, dass einige Autoren (Collins et al. 1997: Humanlymphozyten), den Parameter wegen der dort gefundenen Linearität und auch wegen der Unabhängigkeit von physikalischen Maßstäben (leichtere Vergleichbarkeit mit anderen Systemen, z. B. bei unterschiedlichen Zelltypen) bevorzugen.

Das Tail Moment, das für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurde, integriert die Vor- und Nachteile der beiden anderen Parameter miteinander, wobei ein gewisser Sensitivitätsverlust gegenüber der Tail Length zugunsten eines größeren linearen und robusteren Messbereiches hingenommen wird. Es wird außerdem der Eindruck einer besseren Auflösung (s. 3.4.2.1) als bei den Einzelparametern erreicht, jedoch ist dieser Eindruck mindestens zum Teil darauf zurückzuführen, dass die Dosis-Wirkungs-Kurve zusätzlich durch die rein rechnerische Multiplikation gestreckt ist. Auch Gründe der Vergleichbarkeit mit anderen, neueren Arbeiten (die häufig das Tail Moment verwenden) und vor allem innerhalb des BMBF-Verbundprojektes sprachen für die Verwendung des Tail Moments.

Nachteilig am Tail Moment ist, dass es als Nicht-Basisparameter nicht allgemein standardisiert ist, und somit die oben genannte Vergleichbarkeit wieder relativiert wird. Z. B. kann der Kometenschweif ab Ende oder Mitte des Kometenkopfes oder ab Beginn des Kometen (Letzteres z. B. beim "Comet Moment" von Kent et al. 1995) gemessen werden, die Schwerpunkte von Kopf und Schweif können ermittelt werden (Olive et al. 1990), oder die Fläche kann einbezogen werden ("Tail Inertia" bei Hellman et al. 1995). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tail Moment enthält solche Parameter nicht ("Tail Moment" des Bildanalysesystems KOMET 3.0, Kinetic Imaging, Liverpool, Bezeichnung "Tail Extent Moment" in der neueren Software-Version 3.1 zur Unterscheidung gegenüber dem sog. "Olive Tail Moment"). Der Kometenschweif wurde hier ab Kopfmittle gemessen. Eine Messung des gesamten Kometen wäre aber folgerichtig und erbringt nach Kent et al. 1995 eine hohe Sensitivität. Speziell bei der in der vorliegenden Arbeit gewählten Berechnungsmethode für das Tail Moment besteht außerdem die Gefahr, dass sich gleiche Werte für grundlegend unterschiedliche "Comets" ergeben (Morphologie, Fragmentierungsgrad etc.). Dies ist aber bei den beiden anderen Parametern sogar noch wahrscheinlicher.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die unterschiedlichen Parameter unterschiedliche Vorteile besitzen, die angepasst an die Fragestellung eingesetzt werden könnten. Bei der Prüfung komplexer und verschiedener Proben und variierender Methodik erscheint ein robuster und gut vergleichbarer Parameter sinnvoll, jedoch ist auch höchstmögliche Sensitivität gefragt. Das Tail Moment erscheint dafür als gut geeignet, aber es sollte dessen sensitivste Berechnungsvariante gewählt werden.

Gemäß Literaturvergleich schienen sich die Parameter bei den Fischzellen ähnlich zu verhalten, wie bei Säugerzellen (z. B. Humanlymphozyten). Um zelltypspezifische Besonderheiten zu erkennen, müsste man die verschiedenen Zellsysteme jedoch direkt vergleichen, was entweder Versuche im selben Labor oder eine größere allgemeine Standardisierung der Parameter und Methoden voraussetzt.

4.1.4 Zur Ermittlung der optimalen Expositionszeit

Mit den Experimenten zum Einfluss des Faktors "Expositionszeit der Zellen an die Probe" sollte zunächst die möglichst optimale Zeit für den Comet Assay mit RTG-2-Zellen gefunden werden. Anhand der Experimente mit NQO (40 µg/l) wurde die Expositionszeit von 2 h als am besten geeignet gefunden, sowohl im Hinblick auf eine maximale Reaktion (nach 2-3 h) als auch auf eine möglichst kurze, praktikable Zeit für einen Kurzzeit-Gentoxizitätstest. Die Expositionszeit von 2 h wurde daraufhin bei fast allen Experimenten dieser Arbeit als Standard-Expositionszeit angewandt. Dennoch ist zu bedenken, dass für andere Substanzen bzw. Umweltgemische die Expositionszeit mit der maximalen Wirkung anders ausfallen kann. Besonders für indirekt gentoxische Substanzen, wie das hier ebenfalls im Monosubstanztest verwendete BaP, ist zu erwarten, dass eine maximale Reaktion eine längere Exposition als 2 h erfordert (s. 4.3.1). In der Diskussion zu den indirekt gentoxischen Monosubstanzen wird dies ebenfalls für AAF und DMNA deutlich gemacht (siehe 4.2.1.4 - 4.2.1.6). Auch die Expositionszeit bei RTL-W1-Zellen, die sich beim Testen von Umweltproben als eventuell besser geeignet erwiesen, wurde hier nicht näher untersucht.

Die durchgeführten Experimente zur Kinetik der DNA-Schädigung und DNA-Reparatur-Inhibition gingen über eine bloße Untersuchung der besten Expositionszeit hinaus und daher werden die weiteren Ergebnisse zu diesem Thema nicht hier, bei den methodischen Aspekten, sondern weiter unten unter den zellbiologischen Aspekten ausführlich diskutiert (siehe 4.3.2).

4.1.5 Variabilität und Reproduzierbarkeit

Reproduzierbarkeit bzw. "Präzision" im Sinne der statistischen Definition ist eine wichtige Eigenschaft eines Testsystems. Die Frage nach der Reproduzierbarkeit trägt wesentlich zur Klärung der übergeordneten Fragestellung, ob der Comet Assay als Gentoxizitätstest für Umweltproben geeignet ist, bei. Da die Reproduzierbarkeit aber von methodischen und biologischen Faktoren abhängig ist, ist es sinnvoll, diese Faktoren zu untersuchen, bevor der Test zu einer routinemäßigen Anwendung kommt. So sind die in späteren Teilen dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse in Kenntnis des Reaktionsverhaltens des Assay besser einschätzbar.

Im Kapitel 3.2 wurde zunächst betrachtet, wie sich die Verteilungen der DNA-Schädigungen von je 100 Zellen pro Konzentration in Einzelversuchen verhalten. Dann wurde das in-vitro-Testsystem anhand des Vergleichs von Negativkontrollen und NQO-behandelten RTG-2-Zellen, die aus den Versuchen der sonstigen Fragestellungen dieser Arbeit zusammengetragen wurden, weiter charakterisiert. Neben der grundlegenden Charakterisierung ergab sich eine versuchsübergreifende Sichtweise. Da die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit sich im Prinzip durch die Variabilität der ermittelten Werte ausdrückt, wurden verschiedene diesbezügliche statistische Parameter und Methoden angewandt, die eine quantitative Aussage über die Variabilität aus unterschiedlichen Blickwinkeln erlauben. Diese Parameter und Methoden waren:

- 1) der Vergleich der Tail-Moment-Medianwerte (Lageparameter) mehrerer Versuche bei gleicher Konzentration, z.T. unter Zuhilfenahme von Signifikanztests und Tests zur Bestimmung des benötigten Stichprobenumfangs,
- 2) der Vergleich der LOEC-Werte mehrerer Versuche bei gleicher Konzentration, im Prinzip ein "Spezialfall" von 1),
- 3) Quantile, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten als Streuungsparameter (intra- und inter-experimentell), bzw. wurde hier zusätzlich eine abgewandelte, möglichst analoge Berechnungsmethode zum Vergleich mit den für Normalverteilungen üblichen Kenngrößen vorgeschlagen,
- 4) die statistische Teststärke ("Power").

Außer den hier besonders betonten inter-experimentellen Vergleichen (von Experiment zu Experiment) wurden auch intra-experimentelle Varianzen überprüft.

Literatur zum Comet Assay, in der auf Aspekte der Reproduzierbarkeit eingegangen wird, findet man selten, zu Fischzellen wohl noch gar nicht. So werden in einigen Fällen einige Teilaspekte der Reproduzierbarkeit behandelt (Collins et al. 1997; Hughes et al. 1997) und nur wenige Arbeiten befassen sich gezielt mit der Variabilität bzw. Reproduzierbarkeit (Holz et al. 1995; De Boeck et al. 2000). In letzteren beiden Arbeiten wird auch deutlich gemacht, dass eine Trennung der Varianzen, z. B. in inter- und intra-experimentelle Varianz, Varianz von Elektrophorese zu Elektrophorese, Individuum zu Individuum, Zelllinie zu Zelllinie, Probe zu Probe usw. notwendig ist. Anhand der Daten der vorliegenden Arbeit und anhand theoretischer Überlegung ist es zwar logisch, dass z. B. die inter-experimentelle Verteilung der Messwerte auf den intra-experimentellen Werten, also den Schädigungen einzelner Zellen und den Grenzen der Messparameter basiert, aber nicht allein aus diesen vorhersagbar ist. Die Anzahl der Einflüsse ist bei inter-experimentellen Vergleichen größer.

Man kann daraus schließen, dass die sicherste Methode, um zwei Parameter zu vergleichen, Parallelversuche an ein und demselben Versuchstag (mit denselben Lösungen, Puffern, Temperaturen etc.) sind. Dies wurde dadurch bestätigt, dass sich in den hier durchgeführten Einzelversuchen mit NQO erwartungsgemäß Dosis-Wirkungskurven ergaben, bei denen die Reaktionsstärke mit der Konzentration zunahm, während unterschiedliche NQO-Konzentrationen zwischen verschiedenen Versuchen mit weniger Sicherheit unterscheidbar waren. Leider sind im Comet Assay bisher nur eine relativ begrenzte Anzahl von Proben (9-18) in einem einzigen Versuchsdurchlauf untersuchbar (Vergleich mit anderen Methoden s. 4.5.1 bzw. Anhang 5), sodass das Problem der inter-

experimentellen Varianz nicht umgangen werden kann. Dies betrifft auch den Vergleich von Ergebnissen verschiedener Labors. Dennoch kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass störende Parameter zum einen nachträglich identifiziert werden können und außerdem in der Testanwendung minimiert werden können, sodass die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit verbessert wird. Dieses wurde hier am Beispiel unterschiedlicher NQO-Stammlösungen gezeigt.

Die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit mit dem RTG-2/NQO-Testsystem war in der qualitativen Aussage gut, d. h. die Unterscheidung positiver von negativen Testergebnissen war bei der Substanz NQO mit großer Sicherheit (und mit hoher Sensitivität, s. 3.4, 4.2.1.1, Tab. 32) wiederholbar. Auch die Effekte verschiedener Konzentrationen ließen sich relativ zueinander im Einzelversuch gut identifizieren. Quantitativ war die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit jedoch relativ gering, d. h., es gab einen relativ großen Überlappungsbereich bei der Reaktion - gemessen als Median des Tail Moments von 100 Zellen - auf unterschiedliche Testkonzentrationen. Durch eine Berechnung der statistischen Teststärke ergab sich, dass 14 Versuche für eine Unterscheidung zwischen der Reaktion auf 20 und 40 $\mu\text{g/l}$ NQO notwendig wären; am Aufwand gemessen, eine zu hohe Zahl für ein Routinetestsystem und eine wesentlich höhere Zahl als die hier standardmäßig durchgeführten 3 Versuchswiederholungen. Wie im Ergebnisteil dargestellt und oben gesagt, stellt dies jedoch eine Schätzung eines relativ ungünstigen Falles dar. Diese ungünstige hohe Anzahl von notwendigen Wiederholungen kann zugunsten des Testsystems deutlich verringert werden, wenn die statistische Methodik verfeinert, und die Ursachen der Varianz analysiert und in die Auswertung einbezogen werden.

Geht man davon aus, dass viele Varianzquellen zusammenwirken, so kann der eigentliche Vorteil einer hohen Sensitivität des Comet Assay wohl leicht zu unerwünschten Schwankungen führen. Dass dies eine negative Auswirkung auf die Reproduzierbarkeit hat, ist nur scheinbar richtig. Vielmehr hieße es, dass der Test durch seine Sensitivität besondere Anforderungen an die Konstanz der Durchführungsbedingungen stellt, aber nicht etwa ein an sich unscharfes Reaktionsverhalten zeigt. Um negative Störgrößen einzudämmen, kommt es vor allem darauf an, herauszufinden, gegenüber welchen Parametern der Assay besonders empfindlich ist. Am Beispiel der in dieser Arbeit untersuchten Verwendung unterschiedlicher NQO-Stammlösungen zeigte sich, dass offenbar Unterschiede in den NQO-Realkonzentrationen bestanden. Eine sensitive Anzeige dieser Unterschiede ist durchaus erwünscht. Für dieses Beispiel ist eine mögliche Lösung des Problems, die Realkonzentrationen von Positivkontrollen jeweils analytisch zu bestimmen. Grundsätzlich können die Ursachen für die Varianz aber in allen möglichen methodischen und biologischen Parametern liegen (s. Tabelle 31, 4.1.1). Zunächst sollten vor allem die methodischen Parameter weitestgehend kontrolliert werden, wenn der Aufwand vertretbar ist. Die wirklichen prioritären Parameter, die die Reaktion im Comet Assay beeinflussen, müssen jedoch noch gezielter untersucht und analysiert werden. Die vermutlich wichtigsten Kandidaten sind wohl die folgenden: Die Substanzkonzentration im Verhältnis zur Zelldichte - wobei natürlich noch nichts über die Synchronität der Zellen im Zellzyklus ausgesagt ist, sodass man theoretischer formulieren müsste: Verhältnis der Substanzkonzentration zur Menge der DNA in den Zellen. Schwankungen der metabolischen Kapazität der Zellen könnten ebenfalls eine

Rolle spielen, wiederum wirkt sich dabei die Zelldichte aus, denn je mehr Zellen, desto mehr metabolische Umwandlung wird vermutlich stattfinden.. Auch die Elektrophoresebedingungen haben wohl großen Einfluss. Elektrophoresedauer und angelegte Spannung sind dabei zwar zu nennen, jedoch stellt eine genaue Kontrolle dieser Parameter kein besonderes Problem dar; vielmehr geht es um schwerer kontrollierbare Einflüsse, z. B. kann Varianz zwischen den einzelnen Objektträgern in der Elektrophoresekammer durch Salzaakkumulation zur Kathode hin und durch ungleichmäßige Verteilung des elektrischen Stromes/Feldes entstehen (Singh 2000). Auch Einflüsse subjektiver Natur sind zu diskutieren: Von De Boeck et al. (2000) wurden signifikante Unterschiede bei der Bildauswertung durch unterschiedliche Personen festgestellt (die Autoren benutzten das gleiche Bildanalysesystem wie in der vorliegenden Arbeit, ebenfalls mit semiautomatischer Auswertung). Ob als weitere Störfaktoren Schwankungen von Beschaffenheit und Konzentration der Agaroseschicht in Frage kommen, ist wohl ungeklärt. Vermutlich ist der Einfluss von geringerer Bedeutung.

Dass die zellbiologischen Einflüsse zur Variabilität beitragen, wurde z. B. schon durch den Hinweis auf die Zellzyklusphase angedeutet. Bei den biologischen Parametern kommt es darauf an, wie homogen die untersuchten Zellen sind: In der Zellkultur erwartet man zwar genetisch und funktionell weitgehend gleiche Zellen, vorstellbar sind aber auch Zellen von verschiedenen Tieren oder aber unterschiedliche Zelltypen in einer Probe (z. B. bei Testung von nicht selektierten Blutzellen). Wie groß der Anteil der biologischen Variabilität an der Gesamtvarianz ist, kann hier nicht klar abgeschätzt werden. Ob man zum Ziel hat, die biologische Variabilität einzudämmen, ist eventuell von der Fragestellung abhängig. Wird der Comet Assay als Umwelttest eingesetzt, so könnte es trotz wohl größerer Varianz gewünscht sein, unverändert nicht-homogene Zellpopulationen zu testen, um eine Situation zu simulieren, die der in natürlichen Organismen/Populationen nahekommt. Auch die zu testenden Umweltproben können inhomogen sein und sollten z.T. nativ getestet werden, um das "natürliche" Reaktionsspektrum zu erfassen. Ein breiteres, unspezifischeres Spektrum wird aber zu Lasten der Reproduzierbarkeit gehen. Nach den statistischen Gesetzen würden solche Versuche häufigere Wiederholungen erfordern, um Aussagen zu treffen.

Die Frage, wie sich das RTG-2-Zellliniensystem im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Zellsystemen verhält, kann wegen Unterschieden in der statistischen und sonstigen Methodik nur teilweise geklärt werden. Holz et al. (1995) fanden bei humanen mononukleären Leukozyten eine große Variationsbreite (engl.: Range) bei den Zellen innerhalb einer Probe. Standardabweichungen bzw. Variationskoeffizienten bei Negativkontrollen und H_2O_2 -behandelten Zellen wiesen auf eine Variabilität hin, die im Vergleich zum RTG-2/NQO-Testsystem der vorliegenden Arbeit geringer erscheint. Eine Analyse der statistischen Teststärke (Power) bei diesen Autoren weist ebenfalls auf eine etwas geringere Variabilität hin, allerdings wurde das Konzept dort (mit $\alpha = 5\%$ und Power = 90 %, bei visueller Klassifizierung der "Comets") auf Gruppen von Versuchspersonen angewandt. Die Größenordnung der Anzahl n von nötigen Versuchspersonen scheint aber dieselbe zu sein, wie die in der hier berechneten Anzahl n von nötigen Versuchen: Dort n = 18 Testpersonen für 50 % Effekterhöhung, hier n = 14 Versuche (bzw. korrigiert bis hinab zu nur 3 Versuchen) für ca. 100 % Effekterhöhung. Die Verteilungen bzw. Variabilitäten der DNA-Schädigungen von Zellen scheinen bei den

(Mammalier-) Testsystemen anderer Autoren ebenfalls ähnlich zu sein wie in der vorliegenden Arbeit (z. B. De Boeck et al. 2000, Bauer et al. 1998). Genauso wie hier nimmt der Variationskoeffizient bei Collins et al. (1997) mit zunehmender DNA-Schädigung ab (in der vorl. Arbeit wurde eine abgewandelte Berechnungsmethode für nicht-normalverteilte Daten angewandt, wobei das Ergebnis aber nicht sehr stark vom Variationskoeffizienten differierte). Insgesamt war die Variabilität dort geringer (bei Humanlympozyten), jedoch war u.a. die Bildauswertungsmethode nicht ganz mit der vorliegenden vergleichbar. De Boeck et al. (2000) fanden signifikante Unterschiede - und damit Variabilität - vor allem zwischen verschiedenen Elektrophoresedurchgängen, aber auch zwischen unterschiedlichen Zelltypen, Blutspendern und Auswertern.

Zusammenfassend lässt sich Folgendes sagen:

- Intra- und inter-experimentelle Variabilität wurden untersucht, wobei das Hauptaugenmerk auf der inter-experimentellen Reproduzierbarkeit lag.
- Die vergleichsweise hohe Sensitivität (s. Definition unter 3.4.2.1) macht das Testsystem zur qualitativen Unterscheidung zwischen Negativkontrollen und positiven Proben im Einzelversuch sehr gut geeignet.
- Quantitative Effektunterschiede können *im Einzelversuch* sehr gut voneinander getrennt werden, und somit können Konzentrationsunterschiede in Relation zueinander gesetzt werden. Eine große Anzahl von Versuchswiederholungen ist dafür nicht notwendig, jedoch sind folgende Einschränkungen zu beachten:
- Für quantitative Effektunterscheidung und Rückschlüsse zwischen *verschiedenen Versuchen* (oder den Vergleich zwischen Labors) ist im Gegensatz zur genannten qualitativen oder relativen Unterscheidung eine relativ hohe Anzahl an Versuchswiederholungen notwendig. Mit anderen Worten: Die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit des Testsystems ist bisher nicht zufriedenstellend, was das Arbeiten mit absoluten Werten (für das Tail Moment) betrifft.
- Versuchswiederholungen können dem Zweck dienen, sicherzustellen, dass die Einzeltests valide sind - denn dort ist eine Effektunterscheidung gut möglich.
- Die unter 3.2 ausgewerteten $83 + 54 + 31 = 168$ Versuche waren zur statistischen Absicherung der NQO-Dosis-Wirkungs-Kurven geeignet und stellen eine sichere Grundlage "historischer Werte" dar, anhand derer Einzelversuche oder Versuchsgruppen bewertet werden konnten. Sie konnten als Bezugssystem für die weitere Analyse der Variabilität dienen. (Diese "historischen Versuche" sollten jedoch hier nicht mit denen verwechselt werden, die im Methodenteil (2.9) beschrieben wurden und zur Errechnung eines versuchsübergreifenden Ausschlusskriteriums dienten.)
- Die in dieser Arbeit gefundene, nicht zufriedenstellende inter-experimentelle Reproduzierbarkeit ist einerseits durch Differenzierungen in der Auswertung, andererseits durch technisch-methodische Veränderungen und Zusätze weiter optimierbar. Dazu muss an den prioritär beeinflussenden Faktoren angesetzt werden.
- Hohe Sensitivität gegenüber relevanten Veränderungen wie z. B. Konzentrationsunterschieden ist erwünscht. Der Assay stellt aber damit auch relativ hohe Anforderungen an die Konstanz der zellbiologischen und technischen Parameter bei der Durchführung, um eine möglichst hohe inter-experimentelle Reproduzierbarkeit zu erreichen.

- Die Verteilung von DNA-Schäden im Comet Assay mit der RTG-2-Fischzelllinie scheint bei ähnlichen methodischen Bedingungen grundsätzlich ähnlich wie bei Säugerzellen (Literaturbetrachtung) zu verlaufen, und die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit scheint ähnlich zu sein - die genauen Unterschiede ließen sich wohl nur mit Hilfe direkter Vergleichsversuche herausfinden.
- Beim Einsatz als Umwelttest für komplexe Gemische ist zu vermuten, dass die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit eher geringer als bei Verwendung der gezeigten NQO-Positivkontrollen ist, weil in Gemischen mehr Einflussfaktoren und mögliche Wirkmechanismen zum Tragen kommen. Die Flusswasserprobenbestimmung in dieser Arbeit zeigte zumindest in den Wiederholungsversuchen relativ starke Abweichungen.
- Die Reproduzierbarkeit ist ein wichtiger Parameter zur Bewertung der Eignung als Umwelttest - eine Bewertung wird unten (s. 4.5) im Vergleich mit anderen Testsystemen und unter Betrachtung der getesteten Umweltgemische vorgenommen.

4.1.6 Beurteilung der methodischen Aspekte: Umweltproben-Test *in vitro* mit Fischzellen gegenüber der "Originalmethode"

In den vorangegangenen Abschnitten der Diskussion wurden vorwiegend methodische Aspekte besprochen, die untersucht wurden, um den bisher mehr bei Säugerzellen angewandten Comet Assay an Fischzelllinien anzupassen und weiterzuentwickeln und damit seine Anwendung im Biomonitoring vorzubereiten.

Die das Testergebnis des Comet Assay beeinflussenden Parameter wurden zusammengestellt und in biotische und abiotische sowie in technische, chemische und zellbiologische Faktoren eingeteilt. Zuerst wurden einige von den grundlegenden technisch-methodischen Parametern untersucht. Unmittelbare Vergleichsversuche zu Säugerzellen wurden nicht angestellt, jedoch ein Vergleich mit Literaturdaten war teilweise möglich. Der Vergleich stützte die Annahme, dass sich die DNA verschiedener Wirbeltiere gegenüber der Elektrophorese und weiteren physikochemischen methodischen Einflüssen sehr ähnlich verhält. Auch die Einflüsse der den Zellkern umgebenden Strukturen, die die Präparation der Zellen für den Comet Assay beeinflussen, sind für Fisch- und Säugerzellen quasi identisch, d. h. Membranen, Zytoplasma etc. stellen keine besonderen Barrieren für die relativ extremen Lysebedingungen dar. Grundlegende Methodenoptimierungen bei Fisch- und Säugerzellen dürften damit im Wesentlichen die gleichen sein. Es wurden also keine Unterschiede zwischen Fisch- und Säugerzellen gefunden, die so weit gingen, dass sie entscheidende Bedeutung für die Durchführung der Methode an sich (z. B. Lyse, Elektrophorese) gehabt hätten. Die methodische Übertragung des alkalischen Comet Assay, wie er von Singh et al. (1988) an röntgenbestrahlten menschlichen Lymphozyten angewandt wurde, war damit bis auf wenige Änderungen sehr gut möglich. Die Unterschiede zur Methode von Singh et al. (1988) lassen sich wie folgt gegenüberstellen: Lymphozyten versus Fischzellkulturen (andere Gewinnung und Behandlung der Zellen); Exposition/Bestrahlung der bereits eingebetteten Zellen auf dem Objektträger versus Exposition in Kulturmedium.

Unterschiede zwischen Fisch- und Säugerzellen bestehen wohl bezüglich Schadstoffmetabolismus, DNA-Reparatur und weiterer zellbiologischer Faktoren (s. 4.3).

Solche Faktoren können aber nicht mehr unmittelbar zur Methode des Comet Assay gerechnet werden, obwohl sie dessen Ergebnis natürlich beeinflussen. Feine Unterschiede zwischen Fisch- und Säugerzellen bezüglich des Comet Assay sollten wegen der Störfaktoren, die Variabilität verursachen, in direkten Vergleichsversuchen im selben Labor untersucht werden. Versuche an Säugerzellen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Die biotischen bzw. zellbiologischen Faktoren sind am schwersten vom Experimentator steuerbar. Solche zellbiologischen Faktoren (z. B. Metabolismus und DNA-Reparatur) können aus anwendungsbezogener Sicht als "methodische Faktoren" gewertet werden, sofern sie nicht selbst der Untersuchungsgegenstand sind. Während es im Falle der "klassischen" methodischen Faktoren (Pufferkonzentrationen, Temperaturen, Elektrophoresespannung und -dauer usw.) noch relativ einfach ist, diese konstant zu halten, sind besondere Anstrengungen erforderlich, um komplexe biotische oder Probenfaktoren im Comet Assay zu kontrollieren.

4.2 *In vitro*-Testung von Monosubstanzen und komplexen Umweltproben mit den Fischzelllinien RTG-2 und RTL-W1

4.2.1 Einzelsubstanztests (Monosubstanzen) *in vitro*

Mit dem Test von bekannten gentoxischen bzw. karzinogenen Substanzen sollte das Testsystem in seiner Sensitivität, seinem Reaktionsverhalten und seiner praktisch-methodischen Durchführbarkeit untersucht und optimiert werden. Da die Reaktion auf die Substanz NQO sehr deutlich und von allen hier getesteten Substanzen am sensitivsten war, wurde NQO für Untersuchungen der Testsystemparameter und in weiteren Fragestellungen bevorzugt. Dass NQO auch in anderen Gentoxizitätstests innerhalb des Gentoxizitätsprojektes, an dem die vorliegende Arbeit beteiligt war, häufig und deutlich ansprach, machte es als Positivkontrolle geeignet, sodass in fast allen Tests eine NQO-Probe "mitgefahren" wurde. Anhand von NQO durchgeführte methodische Untersuchungen wurden auch in den vorangegangenen Teilen bereits diskutiert. Im folgenden Abschnitt wird vor allem auf die substanzspezifischen Reaktionen gegenüber den gewählten Substanzen eingegangen, deren Wirkmechanismen erläutert, und die Reaktion der RTG-2 und RTL-W1-Zellen mit anderen Zelltypen und anderen Arbeiten verglichen.

4.2.1.1 4-Nitrochinolin-1-oxid (NQO)

Da NQO die stärkste Reaktion im Testsystem RTG-2 aufwies (LOEC 13-25 nmol/l) und in weiteren Versuchen als Positivkontrollsubstanz und bei Versuchen zur DNA-Reparatur eingesetzt wurde, werden hier Wirkung und Eigenschaften ausführlicher diskutiert.

4-Nitrochinolin-1-oxid ist ein heterozyklisches aromatisches Amin aus einem Chinolin-Grundgerüst mit einem oxidierten N-Atom und einer Nitrogruppe (Abb. 2). Ein natürliches Vorkommen solcher Nitroderivate des Chinolins ist nicht bekannt (Sugimura 1981). 4-NQO ist nach Lewis (1991) ein Klasse II-Karzinogen. Es führt zur Bildung von Addukten an den Purinbasen Guanin und Adenin des DNA-Moleküls. Diese Addukte

können - in sich replizierenden Zellen - wiederum zu Mutationen von DNA-Basen (z. B. GC→AT-Transitionen und GC→TA-Transversionen) führen (Ikenaga & Takebe 1981).

NQO bildet die Addukte nicht direkt, sondern es findet eine enzymatische Umwandlung (metabolische Aktivierung) in den Zielzellen statt: Dabei wird die Nitrogruppe durch Oxidoreduktasen (siehe unten) reduziert und es entsteht 4-HAQO (4-Hydroxyaminochinolin-1-oxid) als proximales Karzinogen. (Der ebenfalls entstehende Metabolit 4-AQO, 4-Aminochinolin-1-oxid, ist nicht karzinogen.) Die Hydroxyaminogruppe wird (durch aminoacyl-tRNA-Synthetasen) mit Seryl- und Prolylresten zum postulierten ultimatsten Karzinogen Seryl- bzw. Prolyl-4-HAQO verestert (Kawazoe 1981; Tada 1981; Bailleul et al. 1989, Nagao & Sugimura 1976). Wohl ohne weitere enzymatische Aktivierung kann nun der Aminoacylrest abgespalten werden und positiv geladene (elektrophile) Carbokationen und Nitreniumionen bilden, die an Guanin und Adenin, bzw. Guanin in der DNA binden (Bailleul et al. 1989).

Der größte Teil der auftretenden Purin-Addukte sind Guanin-Addukte, während die Adenin-Addukte einen geringeren Anteil ausmachen. Sowohl bei *E. coli* als auch in Ratten- und HeLa-Zellen wurde diesbezüglich ein Verhältnis von ca. 90 % zu 10 % gefunden (Ikenaga & Takebe 1981). Auch in der weiteren Literatur werden die drei folgenden Addukte beschrieben: dGuo-N2-4AQO, dAdo-N6-4AQO und dGuo-C8-4AQO (Bailleul et al. 1989, Inga et al. 1994, Galiègue-Zouitina et al. 1985, untersucht an *Mytilus galloprovincialis*: Harvey & Parry 1998). Das Verhältnis beträgt dort z. B. ca. 50 % : 20-25 % : 10 % (Inga et al. 1994).

Die Chinolinstruktur von NQO (Strukturformel s. Abb. 2) legt Redox Eigenschaften nahe, und der erste Schritt der metabolischen Aktivierung ist eine enzymatische Reduktion der Nitrogruppe. Als verantwortliches Enzym wird dabei die DT Diaphorase genannt (untersucht an der BB-Fischzelllinie: Hasspieler et al. 1997; an Rattenleber und -Hepatomas: Sugimura et al. 1966) . Die DT Diaphorase oder NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase (EC 1.6.99.2) reduziert Chinone in einem Zwei-Elektronen-Schritt unter Verbrauch von NADH oder NADPH als Elektronendonator (Parkinson 1996, Forth et al. 1996). Im Gegensatz zu Ein-Elektronen-Reduktionen (wie z. B. durch Cytochrom P450-Reduktase) entstehen dabei jedoch keine reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), sodass eine oxidative DNA-Schädigung durch NQO über DT-Diaphorase unwahrscheinlich erscheint. Dennoch finden sich Hinweise auf oxidative Wirkung von NQO, so z. B. in einem *in vitro*-System mit isolierten Zellkernen und DT Diaphorase (Yano et al. 1995), und auch bei RTG-2-Zellen findet unter Inhibition von DT-Diaphorase eine Reduktion von NQO statt (Nehls & Segner 2001). Es könnten also metabolische Alternativwege (z. B. die genannte Ein-Elektronen-Reduktion) mit Oxyradikalproduktion existieren, oder auch eine Zunahme des oxidativen Stresses infolge einer Deprivation von DT-Diaphorase und/oder NAD(P)H in der Zelle, sodass deren protektive Wirkungen ausfallen (zur teilweise protektiven Wirkung von DT Diaphorase gegenüber gentoxischen Chinonen bei Fisch- und Humanzelllinien siehe Hasspieler et al. 1996; zur antikarzinogenen Wirkung s. Rauth et al. 1997). Bemerkenswert ist die ubiquitäre Verbreitung der verantwortlichen Oxidoreduktasen und aminoacyl-tRNA-Synthetasen, denn diese sind wohl der Grund, dass NQO sowohl in Pro-, als auch in Eukaryonten gentoxisch wirkt. Dennoch bleiben Unterschiede in den Wirkmechanismen - sogar bei näher verwandten Zelltypen - zu

untersuchen. Einige Vorschläge für Experimente, die die oxidative Wirkung von NQO betreffen, werden bereits in Kapitel 4.3.2.3 gemacht.

Der größte Anteil der - im Comet Assay angezeigten - DNA-Strangbrüche durch NQO ist sehr wahrscheinlich auf DNA-Reparaturmechanismen und AP-Stellen zurückzuführen. Dafür sprechen Experimente an reparaturdefizienten Humanzelllinien, die aus *Xeroderma pigmentosum*-Patienten stammen und denen die Enzyme für den Inzisionsschritt in der Nukleotid-Exzisionsreparatur fehlen: XP12-Zellen zeigten im Vergleich zu einer normalen Zelllinie (MRC5) im Comet Assay *keine* Antwort auf NQO (Die XP12-Zellen starben – wahrscheinlich aufgrund der nicht reparierten, aber vorhandenen DNA-Schäden - später ab) (Speit & Hartmann 1995). In der Veröffentlichung von Speit & Hartmann (1995) wie auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Comet Assay-Testantwort an MRC5- bzw. RTG-2-Zellen dagegen durch Behandlung mit Aphidicolin (APC) als Inhibitor der DNA-Polymerasen α , δ und ϵ (Ikegami et al. 1978, Hjertvik et al., 1998) gesteigert und (vorliegende Arbeit) über mehrere Stunden aufrechterhalten werden (Zur Erklärung: die Polymerisation eines neuen DNA-Stranges bei der NER findet *nach* der Inzision statt. Damit werden geöffnete Stellen in der DNA normalerweise schnell wieder geschlossen - diese offenen Stellen bleiben aber durch Hemmung der Polymerisation bestehen - siehe 4.3.2.3). Auch dies spricht wiederum für den Zusammenhang zwischen DNA-Reparatur und NQO-bedingter Reaktion im Comet Assay. Die Addukte scheinen durch Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) "bearbeitet" zu werden. Ein gewisser Anteil (ca. 20 % bei Ikenaga et al. 1977) an DNA-Schäden wird jedoch nicht durch Reparaturinzision, sondern durch einen instabilen Addukt hervorgerufen, der hydrolytisch zerfällt, 4-AQO freisetzt und AP-Stellen zurücklässt. Für diese AP-Stellen nimmt man "x-ray type repair" und auch spontane Entstehung von Strangbrüchen an. Es ist bereits in diesem und weiteren Kapiteln (4.3.2.3) besprochen worden, dass möglicherweise auch oxidative Schäden zu den Strangbrüchen beitragen, und dass darüber mehr spezifische Information gesammelt werden müsste.

NQO wurde früher wegen seiner Wirkung auf UV-sensitive Zellen (wie XP-Zellen oder Mutanten von *E. coli*) auch als UV-mimetisches Agens bezeichnet (Nagao & Sugimura 1976. Die gleichzeitige NQO- und UV-Sensitivität (bezüglich zytotoxischer und karzinogener Wirkung) basierte in solchen Fällen auf Übereinstimmung von DNA-Reparaturmechanismen, speziell der NER.

Die durch NQO verursachten Addukte rufen also unterschiedliche Reparaturmechanismen auf den Plan: Die NER wird durch sog. "bulky adducts", also Läsionen, die starke DNA-Verzerrungen (helical distortions) zur Folge haben, oder die ein Hindernis z. B. für die Transkription (Mullenders 1998) oder evtl. auch für die Replikation (Galloway et al. 1998) darstellen, hervorgerufen (auch die durch UV-Strahlung hervorgerufenen Cyclobutan-Pyrimidindimere sind "bulky lesions"). Dieser Mechanismus trifft wahrscheinlich auf die durch das Carbokation gebildeten, vorwiegenden Addukte dGuo-N2-4AQO und dAdo-N6-4AQO zu (Bailleul et al. 1989). Der dGuo-C8-4AQO-Addukt scheint dagegen ein instabiler, schnell reparabler "non-bulky" Addukt zu sein, der DNA-Polymerase α -unabhängig und auch in UV-sensitiven Mutanten von Säugerzellen und *E. coli* repariert wird (Bailleul et al. 1989, Inga et al. 1994), aber sich als alkali-labile apurinische Stelle im Comet Assay ebenfalls auswirkt.

Die LOEC-Werte für NQO an RTG-2-Zellen lagen bei 13-25 nmol/l = 2,5 - 4,75 µg/l, RTL-W1-Zellen lagen in einem ähnlichen Konzentrationsbereich, jedoch reagierten sie nicht so stark, d. h., die Dosis-Wirkungskurve verlief flacher. Auf mögliche Ursachen der Unterschiede der Zelllinien wird unter 4.3 genauer eingegangen. Der Vergleich mit Literaturwerten des Comet Assay und anderer Gentoxizitätstests zeigt, dass der in dieser Arbeit vorgenommene Nachweis für NQO-Schäden in einem hohen Empfindlichkeitsbereich liegt (Tab. 32). Dies ist bei der gleichzeitigen Praktikabilität beachtlich, also hinsichtlich der relativ kurzen Inkubationszeit (2 h) und der schnellen Durchführbarkeit. Bei einigen der unten angegebenen anderen Gentoxizitätstests beträgt die Expositionszeit dagegen mehrere Tage. Aus diesem Vergleich heraus erscheint die Bezeichnung "hochsensitiv" gerechtfertigt, wenn dies auch ein relativer und nicht klar definierter Begriff ist (siehe Erläuterungen dazu unter 3.4.2.1). Ein ausführlicherer methodischer Vergleich zwischen verschiedenen Gentoxizitätstests wird in Abschnitt 4.5 gezogen.

Tabelle 32: Sensitivitätsvergleich verschiedener Gentoxizitätstestsysteme am Beispiel von NQO.
 Abkürzungen: Comet = Comet Assay; Ames = Ames-Test (auf Agar); Ames flu = Ames-Fluktuationstest;
 UDS = UDS-Test; MNA = Mikronukleus-Test; AFE = Alkalische Filterelution; SOS = SOS-Chromotest;
 UMU = umu-Mikrotest

Zellen	Gentox.- Test- system	Dauer	Sensitivität <i>µg/l</i>	(LOEC) <i>nmol/l</i>	Quelle
RTG-2	Comet	2 h	2,5-4,75	13-25	eigene Versuche
RTG-2	Comet	2 h	2,38	12,5	BMBF-Gentox.-Projekt 1995-1998 (Gloß et al. 2000)
RTG-2	UDS	3 h	19	100	Walton et al., 1983
<i>Opsanus tau</i> - (Fisch) Primär- hepatozyten	UDS	6 h <i>in vitro</i>	0,19	1	Kelly & Maddock, 1985
<i>Ictalurus nebulosus</i> - Fisch-Zelllinie	UDS	18 h	1,9	10	Ali et al., 1993
Danio rerio- (Zebrafisch) Primär- hepatozyten	Comet	20 h <i>in vitro</i> 3 d <i>in vivo</i>	1,9 <i>in vitro</i> 9,5 <i>in vivo</i>	10 <i>in vitro</i> 50 <i>in vivo</i>	BMBF-Gentox.-Projekt 1995-1998 (Gloß et al. 2000) , Froschauer 1998
Danio rerio- (Zebrafisch) Kiemenzellen	Comet	20 h <i>in vitro</i> 3 d <i>in vivo</i>	1,9 <i>in vitro</i> 9,5 <i>in vivo</i>	10 <i>in vitro</i> 50 <i>in vivo</i>	BMBF-Gentox.-Projekt 1995-1998 (Gloß et al. 2000) , Froschauer 1998
V79 Säuger-Zelllinie	Comet	2 h	76	400	BMBF-Gentox.-Projekt 1995-1998 (Gloß et al. 2000)
MRC5- Humanfibro- blasten-Zelllinie	Comet	2 h	3,8	20	Speit & Hartmann, 1995
<i>Pleurodeles walti</i> (Amphibium) Larven	MNA	12 d <i>in vivo</i>	2	10,5	Le Curieux et al., 1993
<i>Dreissena polymorpha</i> - (Muschel) Kiemen- Primärzellen	Comet	2 h <i>in vitro</i>	12,04	63,3	BMBF-Gentox.-Projekt 1995-1998 (Gloß et al. 2000)
<i>Corbicula fluminea</i> (Muschel)	AFE	? h	5	26,3	BMBF-Gentox.-Projekt 1995-1998 (Waldmann et al. 2000)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (einzellige Alge)	Comet	2 h	1	5,3	BMBF-Gentox.-Projekt 1995-1998 (Gloß et al. 2000)
<i>Acanthamoeba castellanii</i> (Protozoon)	Comet	2 h	10	52,6	BMBF-Gentox.-Projekt 1995-1998 (Gloß et al. 2000)

Fortsetzung von Tabelle 32

Zellen	Gentox.- Test- system	Dauer	Sensitivität <i>µg/l</i>	(LOEC) <i>nmol/l</i>	Quelle
<i>Salmonella typhimurium</i> (Bakterium)	Ames flu	? h	0,01	0,05	Hubbard et al. 1981
<i>Salmonella typhimurium</i> (Bakterium)	Ames	3 d	0,3	1,6	Le Curieux et al., 1993
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100 (Bakterium)	Ames	2 d	49,4	260	Ames et al., 1975
<i>Salmonella typhimurium</i> TA7005 (Bakterium)	Ames	1,5 h ?	1	5,3	BMBF-Gentox.-Projekt 1995-1998 (Erdinger et al. 2000)
<i>Salmonella typhimurium</i> (Bakterium)	UMU	2 oder 4 h?	1,9 (DIN-Test) 0,8 (fluorimetr. Test)	10 (DIN-Test) 4,2 (fluorimetr. Test)	BMBF-Gentox.-Projekt 1995-1998 (Reifferscheid & Zipperle 2000); Reifferscheid et al. 1991
<i>E. coli</i> (Bakterium)	SOS	2 h	20	105	Le Curieux et al., 1993

4.2.1.2 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

MNNG ist eine N-Nitrosoverbindung (Abb. 2). Das Klasse-II-Karzinogen nach Lewis (1991) wird heute vorwiegend als Modell-Mutagen/Karzinogen/Teratogen eingesetzt und besitzt ansonsten keine herausragende Verwendung. Bei früheren Herstellungsverfahren war es eine Vorstufe von Diazomethan (US Department of Health and Human Services 1994; IARC 1974). Auch an Regenbogenforellen ist MNNG karzinogen (Review von Bailey et al. 1996; Hendricks et al. 1980; 1995). MNNG ist ein monofunktionales alkylierendes (methylierendes) Agens, das in der Zelle durch SH- oder Aminogruppen (also nichtenzymatisch) aktiviert wird. Es können alle O- und die meisten N-Atome in den DNA-Basen methyliert werden. Z. B. entstehen bei Säugern hauptsächlich 7-Methylguanin, weniger 3-Methyladenin, 1-Methyladenin, 3-Methylcytosin und O⁶-Methylguanin (IARC 1974). Letzteres ist hochmutagen, da es bei der Replikation zu G:C→A:T-Transitionen führt. Dem O⁴-Methylthymidin wird ebenfalls eine bedeutende Mutagenität beigemessen, aber nicht im gleichen Maße wie dem O⁶-Methylguanin. Außer den Methylierungen ist die Entstehung von Radikalen durch MNNG in Zellen nachgewiesen worden. Unter alkalischen Bedingungen nachzuweisende, durch MNNG verursachte DNA-Strangbrüche entstehen vorwiegend durch Basen-Exzisionsreparatur (Methylgruppen sind "non-bulky adducts") und alkalilabile Addukte, aber auch Nukleotid-Exzisionsreparatur findet statt. MNNG ist im UDS-Test positiv (an RTG-Zellen: Walton et al. 1983), außerdem konnten einige Autoren bei Kombination von MNNG mit Reparaturinhibitoren (araC) die Strangbruchrate im Comet Assay erhöhen (Slamenova et al. 1997; Mitchelmore & Chipman 1998a). Miyamae et al. (1997) fanden bei Anwendung des weniger alkalischen pH-Wertes von 12,1 zur DNA-Entwindung im Comet Assay keine Wirkung, während der Effekt bei pH 12,6 auftrat (das gleiche gilt dort auch für NQO). MNNG induziert auch Chromosomenaberrationen

(Kocan et al. 1985; Means & Daniels 1988). Diese korrelieren allgemein mit N-Alkylierungen (Hoffmann 1996). Einige Methylierungen können möglicherweise auch ohne die Erzeugung von Strangbrüchen durch Methyltransferasen entfernt werden (Slamenova et al. 1997).

Der Comet Assay mit RTG-2-Zellen zeigte für MNNG die zweitgrößte Empfindlichkeit (70-140 nmol/l) nach NQO. Dies entspricht den Erwartungen, die sich aus den obigen Erläuterungen ergeben: Es handelt sich um ein direktes Mutagen, das offensichtlich die für die Indikation im Comet Assay typischen DNA-Läsionen hervorruft. Untersuchungen zur Kinetik von Schadensentstehung und -Reparatur sowie Versuche mit DNA-Reparaturinhibitoren wären auch hier zur Aufklärung von Wirkmechanismen interessant, weil MNNG offenbar nicht direkt Strangbrüche verursacht, weil verschiedene Typen von DNA-Läsionen und deren Reparatur zum Effekt im Comet Assay führen.

4.2.1.3 Nitrofurantoin (NF)

NF ist ein Vertreter der Nitroaromaten (Abb. 2), der als antibakterielles Therapeutikum verwendet wird. NF ist ein Klasse-II-Karzinogen nach Lewis (1991). Im anaeroben Bakterienstoffwechsel wird die Nitrogruppe reduziert und reaktive Nitroradikale und Nitrosogruppen, die die DNA angreifen, entstehen (Forth et al. 1996). Auch in eukaryontischen Zellen werden Nitrofurantoin und andere Nitroaromaten über Ein-Elektronen-Reduktionen durch NAD(P)H-abhängige Reduktasen zu Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) metabolisiert, die dann ein Redox-Cycling durchlaufen können, also oxidativen Stress verursachen (s. 1.2). Das Nitrofurantoin- bzw. Xenobiotikum-Radikal gibt sein Elektron an O_2 ab [$\rightarrow O_2^{\bullet-}$] (Superoxidanion-Radikal) und kann dann wieder neu reduziert werden (Garcia Martinez et al. 1995; Di Giulio et al. 1989). Die Enzyme sind im Falle von NF wohl vorwiegend die endosomale Cytochrom P-450-Reduktase und die zytosolische Xanthinoxidase; weitere sind die Ferredoxin-Reduktase und die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Di Giulio et al. 1989). Nitroaromaten können außerdem auch über Zwei-Elektronen-Reduktionen zu Nitroso-, Hydroxylamino- und Amino-Produkten metabolisiert werden, welche an die DNA binden können (äquivalent dem für NQO erläuterten Mechanismus) (Garcia Martinez et al. 1995).

Wie oxidativer Stress entsteht, ist unter 1.2 allgemein beschrieben. Die Zelle besitzt eine Reihe von Abwehrmechanismen mit antioxidativer Wirkung. Dies sind z. B. 1. wasserlösliche Reduktanten wie Glutathion, Ascorbat, Urat; 2. fettlösliche Vitamine wie α -Tocopherol, β -Carotin; 3. Enzyme wie Glutathion-Peroxidase, Katalase, Superoxid-Dismutase (Di Giulio et al. 1989). Wenn die Speicher an protektiven Faktoren erschöpft sind, tritt wohl eine Verstärkung der oxidativen Wirkung in der Zelle auf. Grundsätzlich sind die Abwehrmechanismen induzierbar, jedoch ist dies natürlich ein zeitabhängiger Vorgang.

Ab einer Konzentration von 130 μ mol/l rief NF eine Reaktion im Comet Assay an RTG-2-Zellen hervor. Garcia Martinez et al. 1992 wiesen NADPH-abhängige Sauerstoffradikalproduktion an Fischmikrosomen (Regenbogenforelle u.a.) ab NF-Konzentrationen von 0,5-2,5 mM, also erst bei noch höheren Konzentrationen, nach. Möglicherweise erklärt sich die geringere Sensitivität im Vergleich zu den

adduktbildenden und alkylierenden Substanzen NQO und MNNG aus den zellulären Abwehrsystemen gegen oxidativen Stress und der unspezifischen Wirkweise der Radikale, die ebenso mit nicht-DNA-Zellkomponenten (Proteinen, Membranlipiden, u.a.) reagieren, und so abgefangen werden, bevor sie den Zellkern erreichen und dort direkt DNA-Strangbrüche hervorrufen können. Insgesamt ist bei oxidativem Stress vermutlich immer eine relativ unspezifische DNA-Schädigung anzunehmen, da z. B. auch oxidative DNA-Basen-Veränderungen (z. B. 8-OH-dG) auftreten können, die dann durch Basen-Exzisionsreparatur (BER) (Enzym beim Menschen z. B. 8-Hydroxyguanin-Glycosylase; bei *E. coli* FPG = Formamido-Pyrimidin-Glycosylase; Will et al. 1998) im Comet Assay detektierbar werden. Aufgereinigte BER-Enzyme machen es möglich, solche oxidativen Basenveränderungen im Comet Assay nachzuweisen, indem sie Strangsnitte an den oxidierten DNA-Stellen einführen (Collins et al. 1997).

Dass die geringe Sensitivität der RTG-2-Zellen auf einer besonders hohen, weil *induzierten* Abwehr gegen oxidativen Stress bei der nur 2-stündigen Inkubation der RTG-2-Zellen beruht, erscheint unwahrscheinlich. Neben den oben genannten Gründen für die eher geringere Sensitivität könnte man noch mutmaßen, dass die Enzyme (Reduktasen), die zur Aktivierung von NF führen, nur in geringem Maße vorhanden waren. Im Literaturvergleich findet man positive Ergebnisse bei Hepatozyten von *Salmo trutta in vitro* (500 $\mu\text{mol/l}$), während die Blutzellen Comet Assay-negativ getestet wurden (Mitchelmore & Chipman 1998a).

4.2.1.4 Benzo[a]pyren (BaP)

BaP ist ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff (PAH) (Abb. 2), der relativ häufig vorkommt (Verbrennungsprodukte, Tabakrauch, Teer- und Mineralölprodukte – letztere stellen z. B. häufige Kontaminationen aquatischer Ökosysteme dar: Stegeman 1981; Clark & MacLeod 1977 und Literaturangaben unter 1.1.3 und zu den am besten untersuchten gentoxischen und karzinogenen Substanzen gehört (Philips 1983; Harvey 1991) (Klasse-II-Karzinogen nach Lewis 1991). Auch für Fische ist BaP (und andere PAHs) eine Ursache von präneoplastischen Veränderungen und Tumoren der Leber (Hendricks et al. 1985; Varanasi et al. 1989 Review von Bailey et al. 1996).

BaP ist indirekt gentoxisch, es entstehen eine Reihe von Metaboliten, von denen das Stereoisomer (+) *anti*-Benzo[a]pyren-7,8-Diol-9,10-Epoxid (*anti*-BPDE) der am stärksten gentoxische ist. Dieser elektrophile Metabolit ist ein ultimates Karzinogen (reagiert direkt mit der DNA) und entsteht durch die Aktion von Phase-I-Enzymen: Zunächst findet Epoxidation durch CYP1A1 zu BaP-7,8-Epoxid statt, dieses wird dann durch Epoxid-Hydrolase in BaP-7,8-Diol umgewandelt, und im dritten Reaktionsschritt wird, nun wiederum CYP450-vermittelt, das Diolepoxid gebildet (Conney et al., 1994; Walum et al. 1990). Dieses führt zu Addukten an Guanin, und später zu G→C Transversionen (s. z. B. Denissenko et al. 1996). Die Addukte rufen z. B. bei dem Fisch *Opsanus tau* UDS hervor (z. B. Kelly & Maddock 1985). Die Entgiftung des Metaboliten in der Phase-II findet sowohl als Glutathion-Konjugation als auch als Glucuronidierung statt.

Die Substanz BaP zeigte Effekte bei RTG-2, RTG-2 + S9 und β NF-induzierten RTL-W1-Zellen nur in relativ hohen Konzentrationen (1-5 $\mu\text{mol/l}$ = 236-1211 $\mu\text{g/l}$). Die Sensitivität gegenüber BaP wurde durch externe Metabolisierung mit

Rattenleberhomogenat-Überstand (S9) in RTG-2-Zellen leicht erhöht, erreichte jedoch nicht umweltrelevante Konzentrationsbereiche. Worauf die Unterschiede der verschiedenen Zelllinien und Metabolisierungssysteme beruhen könnten und wie sich weitere Fischzellsysteme in anderen Forschungsarbeiten verhielten, wird ausführlich unter 4.3.1.2 diskutiert. In der Zusammenfassung lässt sich sagen, dass die Metabolisierung, Adduktbildung und anschließende (NER-)Reparatur oder Entstehung von Mutationen durch BaP ein Vorgang ist, der wahrscheinlich über verschiedene Organismengruppen hinweg stark variant ist und damit z. B. im Gegensatz zu NQO steht. So kommen z. B. neben der Aktivierung zu Diolepoxiden zwei weitere indirekte Wege der DNA-Schädigung durch PAHs in Betracht: Die Bildung von Radikal-Kationen und von redox-aktiven o-Chinonen ("oxidativer Stress") (Penning et al. 1999).

Die weiter unten ausgeführten Überlegungen (4.3.1.2) lassen vermuten, dass die Hauptgründe für die in dieser Arbeit gefundene geringe Sensitivität von RTG-2 gegenüber BaP in der kurzen Expositionsdauer, einer geringen metabolischen Aktivierung und dabei relativ leistungsfähigen Deaktivierung liegen.

Auffällig ist, dass die BaP-Nachweisgrenzen in der vorliegenden Arbeit und in den hier genannten und weiteren Arbeiten (z. B. Speit & Hartmann 1995) jenseits der Wasserlöslichkeitsgrenze von nur 6,3 nmol/l (= 1,6 µg/l) (Yalkowsky & Dannenfelser 1990) liegen. Diese Konzentrationen könnten dennoch relevant sein, denn durch andere Inhaltsstoffe im Wasser (bzw. hier im Medium) könnte die Löslichkeit gesteigert sein, außerdem könnte an Partikel gebundenes BaP oder BaP-Niederschläge durch die Zellen, bzw. im Falle einer entsprechenden Umweltkontamination durch Fische aufgenommen werden. Im Experiment stellen mögliche direkt auf den Zellen ausfallende Niederschläge (direkter Kontakt) mögliche Varianzquellen dar.

Der Effekt der externen Metabolisierung mit Ratten-S9 könnte evtl. deswegen gering gewesen sein, weil die Temperatur hier an die Fischzellen angepasst wurde (19° C), also unterhalb des Optimums für diese Säuger-Enzympräparation lag. Zusätzlich muss auch wieder die nur kurze Expositionszeit beachtet werden.

4.2.1.5 N-2-Acetylaminofluoren (AAF)

2-AAF ist ein Karzinogen der Klasse I nach Lewis (1991) (Abb. 2). Auch an Regenbogenforellen ist eine karzinogene Wirkung von AAF nachgewiesen worden (Review von Bailey et al. 1996; Halver 1967). Untersuchungen zu diesem indirekt gentoxischen aromatischen Amin wurden bisher jedoch vorwiegend an Säugern (Ratten) durchgeführt. Wie auch BaP wird 2-AAF durch Phase I-Enzyme aktiviert: Der entscheidende Aktivierungsschritt für 2-AAF (und andere Arylamine) ist die N-Hydroxylierung (MFO-System: CYP450-abhängige Monooxygenasen oder FAD-Monooxygenase). Das proximate Karzinogen N-OH-AAF reagiert danach weiter, z. B. zu N-Acetoxy-AAF (ein N,O-Acetyltransfer, der durch N-Acetyltransferase katalysiert wird). N-Acetoxy-AAF ist instabil und zerfällt in einen Essigsäure- und einen Aminofluorenrest (Deacetylierung), der zur Adduktbildung, vorwiegend am Guanin, führt. dG-C8-AF (N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-Aminofluoren) und dG-C8-AAF (N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-Acetylaminofluoren) sind die häufigsten Addukte bei Mäusen und Ratten (Kriek & Westra 1979; Poirier et al. 1991; Howard et al. 1981). Zu einem geringeren Anteil

entsteht der Addukt dG-N²-AAF N-(deoxyguanosin-N²-yl)-2-acetylaminofluoren), der evtl. eine hervorgehobene Bedeutung besitzt, da er nicht so effektiv repariert wird und damit persistenter als die anderen genannten Addukte ist (Yamasaki et al. 1977; Beland et al. 1982). Die Monooxygenasen der Phase I katalysieren auch Ring-Hydroxylierungen von AAF, die jedoch zur Detoxifizierung führen. AAF kann außerdem von Sulfotransferasen und Glucuronyltransferasen zu gentoxischen Metaboliten umgesetzt werden.

AAF zeigte keine Gentoxizität im Comet Assay an RTG-2-Zellen. Die hier gefundenen Ergebnisse können so interpretiert werden, dass RTG-2-Zellen entweder nicht die entsprechende enzymatische Ausstattung besitzen, um AAF in ausreichendem Maße (während 2 h) zu metabolisieren, oder die Verteilung der Metabolite besitzt möglicherweise einen anderen Schwerpunkt als erwartet: So wurde für AAF von Sikka et al. (1995) in Lebermikrosomen der Forelle ein, verglichen mit der Ratte, häufigeres Vorkommen der Ring-hydroxylierten (also detoxifizierten) Metabolite 7-OH-AAF und 5-OH-AAF und ein 1000-fach geringeres Vorkommen des AAF-DNA-Adduktes N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-Aminofluoren gefunden. Auch Ratten-S9-Leberhomogenat aktiviert Aminofluoren wesentlich stärker als Forellen-S9 (De Flora et al. 1982). Das stimmt außerdem mit einer geringeren Hepatokarzinogenität von AAF in der Forelle verglichen mit Mammaliern überein.

4.2.1.6 Dimethylnitrosamin (DMNA)

Das Nitrosamin DMNA (Abb. 2) war an RTG-2-Zellen praktisch Comet Assay-negativ. Wie AAF und BaP ist DMNA ein indirekt gentoxisches Karzinogen (Klasse I nach Lewis (1991)). Auch an Regenbogenforellen ist es karzinogen (Bailey et al. 1996; Ashley & Halver 1968, Grieco et al. 1978). DMNA wird z. B. durch CYP2E1 am α -Kohlenstoffatom hydroxyliert, in einem Zwischenschritt wird Formaldehyd eliminiert, worauf schließlich Methyl-Kationen abgespalten werden können, die kovalent an die DNA binden (Alkylierung) ein anderer Weg der Metabolisierung von DMNA zu methylierenden Spezies ist die Umsetzung durch DMNA-N-Demethylase. Der häufigste Addukt bei Säugern ist 7-Methyldeoxyguanosin (Degan et al. 1988), aber das in geringerem Maße gebildete O⁶-Methylguanin ist bedeutender, denn es besitzt ein hochmutagenes Potenzial; durch Basen(fehl)paarung mit Thymin bei der DNA-Replikation führt es zur G:C → A:T Transition (Hoffmann 1996).

Wie bei AAF liegen auch bei DMNA die möglichen Gründe für die negative Reaktion in einer mangelnden metabolischen (Phase I-) Aktivierung innerhalb von 2 h oder aber in einer anderweitigen Metabolisierung, die eine gentoxische Schädigung verhindert oder umgeht. Die erste Hypothese wird dadurch gestützt, dass für RTG-2-Zellen verminderte Aktivitäten einiger Phase-I-Enzyme festgestellt wurden (siehe 4.3.1.2). Und generell ist bei diesem wie auch den anderen sogenannten indirekten Gentoxinen wahrscheinlich eine längere Expositionszeit notwendig als z. B. bei NQO. Eine wohl ferner liegende Annahme wäre, dass hier vielleicht ein Fall von Gentoxizität vorliegt, der nicht mit dem Comet Assay detektierbar ist, da Methylgruppen keine "bulky adducts" darstellen und somit keine Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) auslösen (Hjertvig et al. 1998). Statt dessen werden diese direkt, z. B. durch Enzyme wie die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (Lehninger et al. 1998; Coccia et al. 1988) repariert. Zur Beurteilung

dieser Möglichkeit müssten alternative Gentoxizitäts-/Mutationstests herangezogen werden.

4.2.1.7 Zusammenfassung der Monosubstanzversuche

Die Einzelsubstanztests an RTG-2-Zellen zeigten, dass der Nachweis gentoxischer Aktivität im Comet Assay grundsätzlich möglich ist (Ansprechbarkeit), aber substanzspezifisch starke Unterschiede aufweist. Vor allem für die Referenzsubstanzen NQO und MNNG wurden hohe Sensitivitäten (zum Sensitivitätsbegriff siehe 3.4.2.1) und klare Dosis-Wirkungsbeziehungen der RTG-2-Zellen festgestellt. BaP erzeugte erst im Bereich einiger Mikromol/l eine positive Reaktion, NF sprach erst ab 130 $\mu\text{mol/l}$ an, und AAF und DMNA, die bestätigte Karzinogene sind (Klasse I-Karzinogene nach Lewis 1991 – die übrigen Monosubstanzen werden bei Lewis niedriger eingestuft), waren dagegen praktisch negativ (Tab. 1).

Das Ziel, die Monosubstanzversuche zur Entwicklung und Optimierung des Testsystems zu verwenden, wurde erreicht und hauptsächlich mit Hilfe des deutlich und sensitiv reagierenden NQO weiterverfolgt. Vergleiche mit den anderen Substanzen machten jedoch klar, dass es eine allgemeingültig optimale Anpassung nicht gibt.

Zur Erklärung der unterschiedlichen Ansprechbarkeiten und substanzspezifischen Dosis-Wirkungs-Verläufe würden prinzipiell die bekannten Wirkmechanismen der Chemikalien ausreichen, jedoch muss gesagt werden, dass die tatsächlichen Verhältnisse bei den Versuchen dieser Arbeit meist noch nicht geklärt wurden. Es bestehen Unterschiede zwischen Fisch- und Säugerzellen sowie zwischen den Zelllinien bzw. Primärzellen und Zelllinien selbst. Vor allem bei sogenannten direkt gentoxischen Substanzen stimmen aber die Grundmuster überein. Welche Unterschiede in den Wirkmechanismen, enzymatischer Ausstattung und DNA-Reparatur den Reaktionsunterschieden im Einzelnen zugrunde liegen, konnte hier nur ansatzweise erklärt werden (Weiteres zum Metabolismus unter 4.3.1.2 und zur DNA-Reparatur unter 4.3.2). Unterschiedliche mögliche Reaktionswege kommen auch bei den sogenannten *direkt* gentoxischen Substanzen in Frage. RTG-2-Zellen waren besonders gegenüber indirekt gentoxischen Substanzen wenig reaktiv. Darauf und auf die Unterschiede zu RTL-W1 wird an anderer Stelle dieser Arbeit weiter eingegangen.

Die Untersuchungen bis hierhin zeigten, dass das Biotestsystem Comet Assay zum sensitiven Nachweis gentoxischer Wirkungen in Wasserproben an Fischzellen bzw. -zelllinien prinzipiell in der Lage war. Damit waren anhand von Proben, die einzelne bekannte mutagene oder karzinogene Chemikalien enthielten, die Voraussetzungen für die Testung komplexer Umweltgemische unbekannter Zusammensetzung geschaffen.

4.2.2 Umweltproben-Tests *in vitro* (aktives Biomonitoring)

4.2.2.1 Native Oberflächenwasser

Wie in den betreffenden vorangegangenen Kapiteln beschrieben, ist bei der Gentoxizitätstestung eine Testung der Wasserproben im nativen Zustand anzustreben (1.5.2.1, 1.5.2.5, 3.5.1.1), um Verfälschungen bzw. Fehlinterpretationen der Testergebnisse durch eine Vorbehandlung der Proben zu vermeiden. Eine Voraussetzung

für eine solche Testung ist, dass der betreffende Test sensitiv genug ist, um gentoxische Potenziale in den Proben ohne weitere Aufkonzentrierung zu detektieren. Der Comet Assay mit RTG-2-Fischzellkulturen erwies sich hier als ansprechbar und sensitiv. Er ließ sich als standardisierbarer Kurzzeit-Test zur Prüfung nativer Wasserproben in 1:2-Verdünnung einsetzen. Darüber hinaus erfüllte er auch eine weitere Voraussetzung für die Testung nativer Proben: Er musste für unsterile Proben einsetzbar sein. Vergleicht man dies mit anderen Gentoxizitätstests, so ist dies keine Selbstverständlichkeit, da beispielsweise bakterielle Tests wie der Ames- und umu-Test eine vorherige Sterilfiltration erfordern, was wiederum die ursprüngliche Konzentration der enthaltenen Substanzen und Partikel verändert (Erdinger et al. 2000).

Die Gentoxizitätstestung nativer Oberflächenwasser aus Rhein, Elbe und der Wahnbachtalsperre ergab einen relativ hohen Anteil positiver Proben: 31-36 %, je nach statistischer Bewertungsmethode. Die unmittelbaren Schlussfolgerungen zu den Ergebnissen wurden im Ergebnisteil diskutiert. Ein wichtiger Ansatzpunkt der Interpretation war der Vergleich mit den Daten der chemischen Analysen der Oberflächenwasserproben aus dem BMBF-Projekt (Sacher et al. 2000). Dabei konnten keine direkten Korrelationen mit den analysierten 41 gentoxischen aromatischen Stickstoffverbindungen gefunden werden. Wohl aber ließen sich bei Betrachtung der Summenparameter und allgemeinen Kontamination interessante Parallelen zur DNA-Schädigung entdecken. So konnte man die Zunahme des gentoxischen Potenzials im Rhein stromabwärts als zunehmende Konzentration von Schadstoffen deuten, und diese Deutung stimmte überein mit den Ergebnissen der chemischen Summenparameter und mit den flussabwärts zunehmenden Stoffeinträgen aus industriellen und kommunalen Kläranlagen (Sacher et al. 2000). Weniger Anhaltspunkte gab es beim Vergleich von Rhein und Elbe. Im Rhein war gegenüber der Elbe eine höhere Gentoxizität festzustellen, obwohl die chemische Analyse eher für eine stärkere Verschmutzung der Elbe sprach. Dies galt sowohl für die allgemeinen Parameter als auch für einzelne der 41 analysierten gentoxischen Stickstoffverbindungen. Die Ursachen der gentoxischen Wirkung mussten also an anderer Stelle liegen. Man kann vermuten, dass dabei vor allem nicht- oder nur in einem Teil der Proben identifizierte Substanzen (z. B. Arzneimittel) und Gemischtoxizität in Frage kommen. Auch die anorganischen Bestandteile der Proben könnten in Kombination mit den anderen Substanzen und mit zelleigenen Bestandteilen einen Beitrag geleistet haben. Dabei sind vor allem redox-aktive Substanzen wie Nitrat, Nitrit, Fe, Mn u.a. verdächtig. Eine mögliche Schwäche der Analytik lag auch in der notwendigen Filtration der Proben vor der Analyse. Immerhin ließ sich bei den Rhein-Proben tatsächlich oft per Sichtkontrolle ein erhöhter Schwebstoffgehalt feststellen. Diese Schwebstoffe gingen mit in den Zelltest, nicht jedoch in die chemische Analyse. Es ist bekannt, dass an solche Partikel hydrophobe Schadstoffe gebunden sein können (wie z. B. in Vahl et al. 1997), und diese könnten bei Kontakt mit den Zellen in diese übergehen.

Das häufigere Auftreten positiver Effekte in den Proben der wärmeren Monate Mai - August kann mit Hilfe der Analysen ebenfalls kaum erklärt werden. Grobe Parallelen bestehen allerdings beim Rhein zwischen dem DOC-Gehalt und der Wasserführung. Diese Phänomene wurden im Zusammenhang mit einer ebenfalls jahreszeitlichen Abhängigkeit der Ergebnisse des Ames-Tests von einer anderen Arbeitsgruppe desselben Gentoxizitätsprojektes beschrieben (Erdinger et al. 2000). Die Ursachen der Gentoxizität

sind also wiederum ähnlich zu vermuten, wie oben für den Rhein-Elbe-Vergleich geschehen. Besondere Schadstoffe könnten jahreszeitlich abhängig oder temporär zufällig durch Landwirtschaft, Industrie oder Haushalte (Klärwerke) während dieser Monate eingeleitet worden sein. Hinzu kommen Mutmaßungen über jahreszeitlich abhängiges Vorkommen von Mikroorganismen und/oder deren Stoffwechselprodukte und veränderte Schwebstoffgehalte durch veränderte Strömungsbedingungen.

Die mangelnde Korrelation von Analysedaten mit den Biotest-Ergebnissen stellt insgesamt einen Normalfall mit vielen Beispielen in der Literatur dar (z. B. Vahl et al. 1997), im Allgemeinen führt erst eine spezifischere Suche zu Verbesserungen. Für die Verzahnung von Analytik und Biotests sowie zur Lösung spezifischer Probleme bei der Testung der Flusswasserproben könnten nun aufgrund der Ergebnisse Vorschläge gemacht werden, die eher zu einer Erweiterung des Testprogramms führen würden, z. B. noch mehr Substanzen zu analysieren. Hilfreich bei der Interpretation wären auch zusätzliche Informationen über bestimmte Einleitungen und besondere Ereignisse wie Hochwasser, lokale Sedimentaufwirbelungen usw. Zur Optimierung von Analyseverfahren ist es aber ratsam, auch andere Methoden zu entwickeln, die eine spezifischere Interpretation und Identifikation von Schadstoffen möglich machen, ein Beispiel dafür wird unten (4.2.2.3) mit dem "TIE"-Verfahren beschrieben. Durch die mangelnde Korrelation von Analytik und Biotest können natürlich ebenso Zweifel an der Methodik und Aussagefähigkeit des Biotests aufkommen. Einige spezifische Probleme des Comet Assay mit Wasserproben werden im Folgenden diskutiert:

Die Probenlagerung hatte einen Einfluss auf die Testergebnisse. Zu erklären ist die Abnahme der Effekte nach einer länger als 2 d dauernden Probenlagerung wahrscheinlich durch chemischen und biologischen Zerfall bzw. Abbau der Substanzen. Verflüchtigung könnte ebenfalls eine Rolle spielen (nachgeordnet, da die Aufbewahrung in verschlossenen Flaschen stattfand). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Ergebnissen von Eckl (1995), der Oberflächenwasserproben mit dem Mikronukleus-Assay an Ratten-Primärhepatozyten auf Gentoxizität untersuchte.

Eine weitere Kritik könnte sich auf die Reaktionsstärke der Tests beziehen, die bisher schwer interpretierbar ist. Hier besteht sicherlich noch Bedarf für Verbesserungen bei der Varianz/Reproduzierbarkeit des Testsystems. Dieser Komplex wurde unter 4.1.5 bereits diskutiert. Die Variabilität mag bei einer Quantifizierung stören, aber sie kann nicht einfach für signifikant positive Testergebnisse verantwortlich gemacht werden, denn diese waren schließlich jeweils auf die Negativkontrollen bezogen. Die qualitative Aussage ist valide.

Die Ergebnisse des Comet Assay allein sagen über die Beschaffenheit der Wasserproben nichts aus, daher ist eine begleitende Analytik unbedingt zu empfehlen. Diese kann aber nur sinnvoll sein, wenn einerseits Grundparameter oder aber andererseits klar auf der Grundlage von Indizien ausgewählte Spezialparameter untersucht werden. Eine Analyse auf oberflächlichen Verdacht ist dagegen meist fruchtlos. Die biologische Relevanz der Testergebnisse, wie "gefährlich" eine Wasserprobe ist, ist ebenfalls besser zu entscheiden, wenn die verantwortliche Substanz genau bekannt ist. Es besteht auch ein Bedarf, die genauen Sensitivitätsgrenzen für die chemisch analysierten gentoxischen Substanzen im Comet Assay zu erforschen. Letztlich wird natürlich zu beachten sein, dass reale

Umweltgemische abweichende Ergebnisse erbringen werden - Einzelsensitivitäten würden also nur eine gewisse Arbeitsbasis schaffen. Darüber hinaus müssen die Zusammenhänge mit den möglichen Folgeschäden von DNA-Strangbrüchen weiter aufgeklärt werden (siehe ausführliche Diskussion der biologischen Relevanz 4.3.2.7 und 4.5.3). Als sensibler Indikator für gentoxische Belastung in Wasserproben besitzt der Comet Assay *in vitro* aber offensichtlich ein hohes Potenzial.

4.2.2.2 Kontaminierte Probe "Sanierungsgebiet Gaswerk Düsseldorf"

Die mit PAH und BTEX kontaminierte Sonderprobe "Sanierungsgebiet Gaswerk Düsseldorf" (Analysedaten wurden projektintern erstellt) zeigte eine überraschend niedrige Gentoxizität an RTG-2-Zellen. Angesichts der relativ starken Kontamination war es auch erstaunlich, dass keine Zytotoxizität auftrat. RTL-W1-Zellen + β NF reagierten dagegen stärker auf die Probe: sie zeigten eine mittelstarke DNA-Schädigung. Die Schlussfolgerung ist wiederum, dass RTG-2-Zellen eine zu geringe Metabolisierungskapazität besitzen, um die in der Probe enthaltenen Stoffe (3.5.1.8), die wohl am ehesten indirekt gentoxisches Potenzial aufweisen, zu aktivieren. RTL-W1-Zellen besitzen dagegen offenbar eine gewisse Aktivität von Phase I-Enzymen (siehe 4.3.1.2). Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen, die anhand der indirekt gentoxischen Monosubstanzen BaP, AAF und DMNA gewonnen wurden. Da die Konzentrationen einzelner PAHs wie BaP in der Probe unter der analytischen Nachweisgrenze lagen, und die summarischen Parameter sich in Bezug auf PAHs je nach Analysemethode unterschieden, ist eine Interpretation schwierig und der direkte Vergleich mit der Monosubstanztestung leider ausgeschlossen.

Eine zeitlich später eintretende Reaktion der RTG-2-Zellen in Bezug auf Gentoxizität und Zytotoxizität erscheint angesichts der hohen Kontamination der Probe und angesichts von Ergebnissen anderer Teilnehmer des BMBF-Gentoxizitätsprojektes mit der Gaswerks-Probe möglich, wurde jedoch nicht weiter verfolgt

4.2.2.3 Wirkungsbezogene Analytik/TIE: Sedimentextrakte

Der Ausgangs-Extrakt von Sediment aus dem Spittelwasser, F_{ges} , erwies sich als zytotoxisch an RTG-2 und RTL-W1, und die daraus gewonnenen 7 Hauptfraktionen waren alle gentoxisch an RTL-W1-Zellen (und mit Ausnahmen auch an RTG-2). Da der Extrakt ein komplexes Gemisch vielfacher und starker Kontaminationen darstellte (N-Phenyl- β -Naphthalenamin, Prometryn, PAHs, PCBs, polychlorierte Naphthalene = PCNs, Methylparathion, Alkane, Schwefel, u.a. (Brack et al. 1999), kamen als Ursachen entweder jeweils in jeder Fraktion verschiedene gentoxische Substanzen in Frage, die einzeln oder als Gemisch (z. B. additiv oder überadditiv) wirksam waren, oder aber die Wirkung war unspezifisch ("zytotoxisch") und beruhte z. B. auf oxidativem Stress infolge Überforderung der Biotransformationsenzyme. In der ausgewählten Fraktion F3 wurde die Gentoxizität hauptsächlich auf Inhaltsstoffe der Subfraktion F3.6 zurückgeführt. Die chemische Hauptkomponente in dieser Subfraktion war Dimethylparathion. Diese Substanz konnte aber nicht als gentoxisch evaluiert werden, statt dessen wurde eine durch das Extraktionsmittel Tetrahydrofuran (THF) erzeugte Gentoxizität festgestellt, die z. B. auf Peroxide zurückzuführen sein könnte, die in sich THF bilden können (W. Brack, UFZ Leipzig, persönl. Mitteilung). Dies zeigt die Wichtigkeit, die Methoden in der

wirkungsbezogenen Analytik an die Biotestsysteme anzupassen und liefert ein Argument für die außerdem in dieser Arbeit vorgenommene Testung vollkommen unbehandelter (nativer) Proben. Andererseits zeigt sich auch das Potenzial dieser Methode, scharfe Aussagen ("Ja/Nein") über die Wirkung bestimmter Inhaltsstoffe zu machen.

4.2.2.4 Zusammenfassung zu den Umweltproben-Tests *in vitro*

Da die meisten Aspekte der Umweltprobentestung *in vitro* bereits in der Diskussion zu den Versuchen mit den nativen Wasserproben aus Rhein und Elbe zusammengefasst wurden, soll hier hauptsächlich darauf verwiesen werden (4.2.2.1). Darüber hinaus zeigte sich auch bei der Testung der Gaswerksproben und Sedimentextrakte aus dem Spittelwasser, dass meist nur eine zielgerichtete chemische Analytik erfolgreich und hilfreich ist, während eine ungerichtete oder selbst eine auf grobem Verdacht basierende Analytik aufgrund der Vielzahl möglicher und unbekannter Kontaminanten und Kombinationen eher mit einem Glücksspiel zu vergleichen ist. Die Anwendung einer wirkungsbezogenen Analytik (TIE - Toxicity Identification and Evaluation), die hier auch mit dem Comet Assay zur Identifikation einer gentoxischen Substanz führte, erscheint daher als eine richtige Konsequenz; sie ist aber für eine Routinetestung wohl noch zu aufwendig.

Die Versuche mit Gaswerksproben und Sedimentextrakten ergaben außerdem Hinweise darauf, dass RTL-W1-Zellen möglicherweise besser zur Detektion von gentoxischen Substanzen in Umweltproben geeignet sind, als RTG-2-Zellen. Dies wird in folgenden Abschnitten noch diskutiert werden.

4.3 Zellbiologische Aspekte als Einflussfaktoren der Gentoxizität und ihre Indikation im Comet Assay

Die zellbiologischen Vorgänge, die zur Entstehung einer Reaktion im Comet Assay führen, sind unter der gegebenen Zielstellung eher als Teil der Methode anzusehen (Versuchsobjekte sind die getesteten Proben), jedoch werden die Zellen zur Erforschung der Ursachen der Gentoxizität und zur späteren Beurteilung der biologischen Relevanz auch selbst zum Versuchsobjekt. Die wichtigsten zellbiologischen Faktoren sind hier wohl die Metabolisierungskapazität bzw. enzymatische Ausstattung und die DNA-Reparaturkapazität der Zellen. Darauf wurde bereits im Abschnitt zu den Monosubstanzen (4.2.1) hingewiesen, und dies soll nun vertieft werden. Als möglicher Störfaktor stellt sich im Comet Assay das Phänomen der Apoptose dar, was ebenfalls hier diskutiert werden wird.

4.3.1 Einfluss von Metabolisierungskapazität und enzymatischer Ausstattung der Zelllinien

4.3.1.1 Vergleich von RTG-2 und RTL-W1+ β NF bei Monosubstanzen und Umweltproben

Inwieweit gentoxische Substanzen oder Proben als solche zu betrachten sind, ist immer vom Testmaterial, d. h. den verwendeten zellulären Systemen, abhängig. In der

Diskussion zu den Monosubstanzen (4.2.1) wurde deutlich, dass die Reaktion auf diese Modellmutagene und -Karzinogene selbst bei sogenannten direkt gentoxischen Stoffen von der metabolischen Aktivierung und Inaktivierung und der DNA-Reparatur abhängig ist. Die vorliegende Arbeit sollte Daten zu den bisher im Vergleich zu Säugern weniger untersuchten Fischzellen liefern. Dabei konnten hier bereits bei den beiden untersuchten Fischzelllinien RTG-2 und RTL-W1 + β NF *in vitro* unterschiedliche gentoxische Reaktionsmuster festgestellt werden:

In den Reaktionen auf BaP und NQO zeigte sich für die beiden Zelllinien ein leicht komplementäres Muster: RTL-W1 + β NF waren im Vergleich zu RTG-2-Zellen für NQO geringfügig insensitiver und zeigten eine eindeutig kleinere Steigung der Dosis-Wirkungskurve, während sie geringfügig sensitiver mit einem etwas steileren Kurvenanstieg für BaP waren, als die RTG-2-Zellen (diese Ergebnisse sind publiziert worden in Nehls & Segner 2001). Bei der Testung von Umweltproben, nämlich der Spittelwasser-Sedimentextrakte und der PAH- und BTEX-kontaminierten Gaswerks-Wasserprobe war RTL-W1 + β NF empfindlicher als RTG-2.

4.3.1.2 Metabolisierungskapazitäten und Induzierbarkeit von RTG-2- und RTL-W1-Zellen

Eine mögliche Erklärung für die qualitativ verschiedenen Reaktionsmuster der beiden Zelllinien im Gentoxizitäts-Assay ist die, dass die Zellen unterschiedliche Metabolisierungsaktivitäten besitzen. Sowohl für BaP als auch für die Umweltproben könnte die größere Sensitivität der β NF-induzierten RTL-W1-Zellen in einer höheren Phase I-Biotransformationskapazität begründet sein. Im Falle von NQO könnte dagegen eine geringere Aktivierung als bei den RTG-2-Zellen vorliegen.

Bei der Toxifizierung indirekter Gentoxine, z. B. bei indirekt gentoxischen PAHs, spielt vor allem das MFO-System (Mixed-Function Oxygenase System, Cytochrom-P450-System, Phase I der Biotransformation) eine entscheidende Rolle. Beide Zelllinien weisen eine gewisse induzierbare Cytochrom P4501A-Aktivität auf, jedoch ist sie bei RTL-W1-Zellen stärker. So wurde in unserem Labor eine durch BaP induzierte EROD-Aktivität von 6,7 pmol/mg/min (Mittelwert, n = 3) für RTG-2 gegenüber 15,9 pmol/mg/min (Mittelwert, n = 7) für RTL-W1 gemessen (H. Segner, UFZ Leipzig, unveröffentlicht). Auch ließ sich durch Inkubation mit β NF die EROD-Aktivität der RTL-W1-Zelllinie stärker als bei RTG-2-Zellen induzieren (26,47 gegenüber 12,62 pmol/mg/min nach 24 h Inkubation mit 500 nmol/l Nehls & Segner 2001). Die basale (nichtinduzierte) EROD-Aktivität beider Zelllinien war ungefähr gleich und lag ca. um das 20-fache niedriger als bei induzierten RTL-Zellen. In Metabolisierungsstudien mit radioaktivem BaP wiesen die beiden Zelllinien vergleichbare Umwandlungsraten auf, nämlich 0,32 (RTG-2) und 0,38 (RTL-W1) μ g BaP konvertiert/ 10^7 Zellen/20 h (H. Segner, UFZ Leipzig, unveröffentlicht). Auch Lee et al. (1993) hatten bereits die Induzierbarkeit der EROD-Aktivität von RTL-W1-Zellen durch β NF festgestellt (72 h Exposition). Weitere Daten zur Cytochrom P450-Induktion finden sich in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe: Behrens et al. (2001) untersuchten RTL-W1-Zellen und Primärhepatozyten von *O. mykiss*, jedoch keine RTG-Zellen. Relevant für die vorliegende Arbeit ist hier, dass eine Induktion (durch 3-Methylcholanthren) nach 6 h noch gar nicht stattgefunden hatte, sondern erst nach 12 h, um dann bei weiterer Verlängerung weiter anzusteigen; z. B. auf

das ca. 50-fache des Negativkontrollniveaus nach 48 h bei RTL-W1-Zellen. Primärhepatozyten hatten eine höhere basale (nichtinduzierte) EROD-Aktivität, eine größere Induktionsspanne und höhere maximale Aktivität nach Induktion als RTL-W1-Zellen. Die Variabilität der Ergebnisse war aber auch wegen der individuellen Unterschiede der Fische größer als bei der Zelllinie. In den Untersuchungen von Zabel et al. (1996) und von Pollenz & Necela (1998) wurde eine deutliche Induzierbarkeit auch bei RTG-2-Zellen nachgewiesen, allerdings bei Expositionszeiten ab 6 - 8 h. Zabel et al. (1996) induzierten die CYP1A-Aktivität in RTG-2-Zellen durch Dioxine und andere Stoffe (TCDD, PCDD, PCDF und einige PCB-Kongenere, 6 h Expositionszeit), maßen aber nicht die Enzymaktivität, sondern die Genexpression in Form der CYP1A mRNA. Die so gemessene, dosisabhängige Induktion konnte 50- bis 200-fach über dem Niveau der Negativkontrolle liegen.

Das Gesagte lässt folgern, dass die CYP1A-Aktivität der RTL-W1-Zellen bei den Gentoxizitäts-Experimenten in der vorliegenden Arbeit nach 18 h Vorinkubation mit β NF wohl bereits induziert war, während die RTG-2-Zellen während der zweistündigen Inkubation mit BaP oder AAF vermutlich noch keine nennenswerte Aktivität besaßen. Auf diesen Unterschied in der Metabolisierungskapazität der beiden Zellsysteme könnte die stärkere Reaktion der RTL-W1 auf BaP zurückzuführen sein, weil das indirekte Gentoxin hier stärker aktiviert wurde. Da RTL-W1 auch meist stärker auf die hier getesteten Umweltproben (Spittelwasser-Sedimentextrakte, Probe v. Gaswerk Düsseldorf) reagierte, wäre es auch eine Erklärung, dort ebenfalls indirekt gentoxische Stoffe mit entsprechendem Aktivierungsweg zu vermuten.

Zur Hypothese, dass eine höhere CYP1A-Aktivität zu einer höheren Gentoxizität führt, würden auch die Ergebnisse von Devaux et al. (1997) passen. So konnte im Comet Assay an Forellen-Primärhepatozyten eine signifikante Induktion von Gentoxizität bei einer BaP-Konzentration von 1×10^{-7} mol/l (= 25,2 μ g/l) nachgewiesen werden, trotz der relativ geringen Expositionsdauer von nur 4 h (ohne S9-Aktivierung). Im selben Empfindlichkeitsbereich lagen auch die vom Karpfen abgeleiteten EPC-Zellen (25 μ g/l ohne S9, 2,5 μ g/l mit Fisch-S9 ;2 und/oder 24 h bei 8° C) in einer Untersuchung von Kammann et al. (2001).

Die Kenntnis der Metabolisierungsaktivität in Bezug auf CYP1A gestattet jedoch keine direkte Aussage über die gentoxische Wirkung eines Stoffes, selbst wenn es sich um eindeutig CYP1A-aktivierte Substanzen wie BaP handelt. So konnten Ploch et al. (1998) bei einem Vergleich von zwei Welsarten (*Ameriurus nebulosus* und *Ictalurus punctatus*) zeigen, dass die Höhe der Cytochrom P4501A-Aktivität eindeutig *nicht* korrelierte mit der gentoxischen Wirkung von BaP bei diesen Spezies. Auch Masfaraud et al. (1992) zeigten bei Primärhepatozyten der Regenbogenforelle, dass die DNA-Adduktbildung durch BaP nicht einfach mit der EROD-Induktion einherging (siehe auch 4.4.2). Es ist jeweils die Vollständigkeit der Metabolisierungssysteme ausschlaggebend, die schließlich zur Entstehung von ultimativen Karzinogenen/Gentoxinen führen. Als weiteres Beispiel nur geringer gentoxischer Reaktion (Adduktbildung) durch polyzyklische Aromaten lässt sich die Arbeit von Smolarek et al. (1987) nennen. Da die Untersuchung an den Fischzelllinien RTG-2, BB und BF-2 durchgeführt wurde, zeigt sich hier Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die genannten und andere Autoren (Diamond & Clark 1970; Thornton et al. 1982) fanden eine relativ hohe

Kapazität der RTG-2 zur Phase-II-Metabolisierung von BaP zu wasserlöslichen Metaboliten, v.a. zu Glutathionkonjugaten von BaP und Glucuronsäure, also eine Detoxifizierung vor allem auch von BaP-7,8-Diol (BaP-Stoffwechselwege siehe 4.2.1.4). Die Untersuchungen von Smolarek et al. (1987), bei denen ja eine gewisse Menge BaP-Addukte mit radio-chromatographischen Verfahren nachgewiesen wurde, wurden mit deutlich längeren Expositionszeiten (24 - 144 h) als in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Dennoch war das Vorkommen des (+)-*anti*-BaPDE-dG-Adduktes immer noch geringer als in Säugerzellen. Varanasi et al. (1989) wiesen den Addukt bei *Parophrys vetulus* nach, in diesem Fall mit der ³²P-Postlabeling-Technik.

Für Unterschiede in der gentoxischen Reaktion auf BaP lassen sich weitere Beispiele auflisten, die zum Teil zelltypespezifisch sind: Leber- und Kiemenzellen von *Danio rerio* waren Comet Assay-negativ (Gloß et al. 2000; Froschauer 1998). Mitchelmore & Chipman, (1998a) fanden in Bachforellen- Hepatozyten (*Salmo trutta*) nach 1 h Exposition mit dem Comet Assay einen LOEC von 50×10^{-6} mol/l, während die Blutzellen dieses Fisches gar nicht reagierten. Die Metabolisierung, Adduktbildung und anschließende (NER-)Reparatur oder Entstehung von Mutationen durch BaP muss offensichtlich als ein Vorgang angesehen werden, der über verschiedene Organismengruppen und sogar Zelltypen hinweg stark variant ist und damit z. B. im Gegensatz zu NQO steht. Das wird außerdem noch untermauert, wenn man neben der Aktivierung zu Diolepoxiden zwei weitere indirekte Wege der DNA-Schädigung durch PAHs in Betracht zieht: Durch Bildung von Radikal-Kationen und von redox-aktiven o-Chinonen ("oxidativer Stress") (Penning et al. 1999).

In Zusammenfassung des Gesagten kann man nun also argumentieren, dass durch vorhandene Enzymaktivitäten die Grundvoraussetzung für eine gentoxische Aktivierung entsprechender Substrate erfüllt ist, also Verdachtsmomente auf ein Grundrisiko bestehen. Ein besonders enger oder gar linearer Zusammenhang ist deswegen jedoch nicht zu erwarten. Die gezeigten eigenen Ergebnisse würden in diese Argumentationslinie hineinpassen. Die bei RTG-2-Zellen durchaus ausgeprägte Detoxifizierung und die weiteren genannten Stoffwechselwege könnten also neben einer kurzen Induktionszeit ebenfalls Gründe für die hier geringe Gentoxizität von BaP bei diesen Zellen sein.

Schließlich sind darüber hinaus noch folgende mögliche "Störfaktoren" zu berücksichtigen:

βNF, welches hier zur CYP450-Induktion verwendet wurde, zeigte bei Gagné & Blaise (1995) und bei Pacheco & Santos (1997) gentoxische Wirkung an Primärhepatozyten. Obwohl in der vorliegenden Arbeit immer die signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollen geprüft wurde, traten doch bei den βNF-induzierten RTL-Zellen häufig hohe Grundschädigungen in den Kontrollen auf, sodass die gemessenen Effekte gegenüber den endgültigen Proben möglicherweise durch Vorschädigung beeinflusst waren (z. B. additive Wirkungen und/oder abgeschwächte DNA-Reparaturmechanismen).

Für BaP sollte außerdem angemerkt werden, dass die Konzentrationen, bei denen - vergleichsweise geringe - Reaktionen auftraten, bei beiden Zelllinien sehr hoch waren und bereits über der Wasserlöslichkeitsgrenze von BaP lagen, sodass eine biologische

Relevanz der Unterschiede im "Normalfall" (geringe Kontamination) wohl eher nicht zu erwarten ist.

Die Reaktionen auf **NQO** müssen getrennt von den obigen betrachtet werden. Hier liegt ein anderer metabolischer Aktivierungsmechanismus vor, der unter 4.2.1.1 () beschrieben ist. In der vorliegenden Arbeit wurden durch Transferexperimente mit "gebrauchten" und "frischen" NQO-Expositionsmedien starke Hinweise auf eine Metabolisierung von NQO durch RTG-2-Zellen gefunden: Es zeigte sich, dass NQO von den Zellen "verbraucht" wird (3.3.3.1 und veröffentlicht in Nehls & Segner 2005).

Auf der Seite der gentoxisch aktivierenden Mechanismen spielt bei der Metabolisierung von NQO laut Literatur die DT Diaphorase (NAD(P)H-Chinon-Oxidoreductase) eine Rolle. Unsere Untersuchungen zu diesem Enzym (Nehls & Segner 2001) zeigten eine höhere Aktivität bei den RTL-W1-Zellen. Dennoch war die gentoxische Reaktion dort schwächer. Als Erklärung dafür kommen folgende Gründe in Frage:

- 1) die Rolle der DT-Diaphorase könnte sich selbst bei diesen nahestehenden Zelllinien so unterscheiden, dass sie bei RTG-2-Zellen stärker aktivierend wirkt - für Ähnliches gibt es Hinweise bei Hasspieler et al. (1996, 1997);
- 2) die nicht-Diaphorase-abhängige Aktivierung von NQO, z. B. mit Ein-Elektronen-Reduktionen unter Beteiligung anderer Enzyme wie der Cytochrom P450-Reduktase (s. 4.2.1.1) könnte in RTG-2-Zellen die ausschlaggebende Rolle spielen - tatsächlich war die Reduktion von NQO bei den RTG-2-Zellen in unserer Untersuchung in geringerem Maße von DT-Diaphorase abhängig als bei RTL-W1 (Nehls & Segner 2001). Auch die Erzeugung von oxidativem Stress durch NQO und die antioxidativen Kapazitäten der beiden Zelllinien könnten für Unterschiede - unabhängig von der DT-Diaphorase - verantwortlich sein;
- 3) sonstige vor- oder nachgeschaltete protektive Mechanismen bei RTL-W1 könnten überwogen haben; so z. B. Mechanismen, die die Konzentration des alkylierenden Metaboliten noch vor der Bindung an die DNA verringerten, oder eine effektivere DNA-Reparatur danach.

4.3.1.3 Bewertung des Testsystems mit RTL-W1- gegenüber RTG-2-Zellen

Nach den besprochenen Unterschieden stellt sich die Frage, ob eine der beiden Zelllinien als besser geeignet für den Umwelttest eingestuft werden kann.

RTL-W1-Zellen scheinen nach den Ergebnissen dieser Arbeit ein höheres Potenzial zur Auffindung gentoxischer - vor allem indirekt gentoxischer - Substanzen in komplexen Umweltgemischen zu besitzen als die RTG-2-Zelllinie. Insgesamt scheinen RTL-W1-Zellen, die ja aus der Forellenleber abgeleitet sind, außerdem eine höhere "Verwandtschaft" mit direkt aus der Forelle isolierten Primärhepatozyten aufzuweisen, denn ihre induzierbare Cytochrom P4501A-Aktivität liegt zwischen der von RTG-2 (niedrig, siehe oben) und Primärhepatozyten (hoch, Behrens et al. (2001)). Als *in vitro*-Modell für Forellenhepatozyten sind RTL-W1-Zellen auch bereits von anderen Autoren

den RTG-2-Zellen vorgezogen worden, da deren Aflatoxin-B1-Biotransformation und maligne Transformation den Hepatozyten stärker ähnelt (Bechtel & Lee 1994).

In der vorliegenden Arbeit konnte beim Vergleich von β NF-induzierten RTL-W1-Zellen (erstes System) mit einer externen metabolischen Aktivierung durch Rattenleber-S9 bei RTG-2-Zellen (zweites System) kaum ein Sensitivitätsunterschied gefunden werden. Bei der Prüfung der Sedimentextrakte zeigte sich bei Verwendung von S9 sogar eine gewisse Abschwächung der Reaktion gegenüber den anderen Systemen. Solche reduzierenden Effekte sind z. B. durch Bindung an S9-Proteine möglich und werden von Benford et al. (1988) und White et al. (1996) berichtet. Die "interne" metabolische Aktivierung der RTL-W1 ist methodisch unkomplizierter als die externe metabolische Aktivierung und in Bezug auf Fischzellen natürlich aussagefähiger als bei der Verwendung von S9 aus der Leber der Ratte. Diese Argumente sprechen dafür, eine gegebene interne metabolische Aktivierung - wie bei den RTL-W1-Zellen - einer nachgeschalteten S9-Supplementierung vorzuziehen. Auch aus ethischer und ökonomischer Sicht hätte der Verzicht auf S9 Vorteile, weil auf Spendertiere und deren Vorbehandlung verzichtet werden könnte.

Andererseits weisen aber die RTG-2-Zellen Vorteile in der Praktikabilität für die Verwendung in Biotests gegenüber RTL-W1 auf.: Die RTG-2-Zellen besitzen einen höheren Verbreitungsgrad (am längsten etablierte Fischzelllinie, erhältlich über Zellbanken), was dem Routineeinsatz entgegenkommt. Weiterhin sind RTG-2 methodisch merklich leichter zu handhaben. Das Auftreten von Negativkontrollen mit DNA-Schaden war hier im Gegensatz zu den RTL-W1-Zellen auch nicht festzustellen - wobei die genauen Ursachen dafür allerdings nicht geklärt sind.

Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, müssten bei beiden Zelllinien noch Maßnahmen getroffen werden und die prioritären Ursachen für Varianz festgestellt werden. Bei der Testung von Wasserproben ist immer auch mit multiplen Wirkungen zu rechnen; z. B. verursachten einige Wasserproben ein stärkeres Anheften der Zellen. Darauf muss dann in der Präparation reagiert werden, was sich wiederum negativ auf die genaue Einhaltung aller Parameter auswirken kann. Solche Probleme traten eher bei RTL-W1- als bei RTG-2-Zellen auf.

Zusammenfassende Bemerkungen und Vergleich mit anderen Zelltypen:

Bei dem für die Gentoxizität wichtigen zellbiologischen Faktor Metabolismus traten zelltypspezifische Besonderheiten hervor, sowohl im Vergleich von Fisch- und Säugerzellen, als auch zwischen RTG-2- und RTL-W1-Zellen. Diese Unterschiede sind - zusammen mit der DNA-Reparatur - verantwortlich für die unterschiedlichen gentoxischen Reaktionen auf die getesteten Proben. Dabei zeigten RTG-2-Zellen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber dem indirekt gentoxischen BaP und zwei Umweltproben als β NF-induzierte RTL-W1, während bei NQO eine umgekehrte Tendenz bestand. Die Empfindlichkeit gegenüber indirekt gentoxischen Stoffen war bei den gegebenen Bedingungen generell gering, was möglicherweise auf die kurze Expositionszeit zurückzuführen war.

Die betrachteten Daten und weitere Literatur scheinen dafür zu sprechen, dass die Metabolisierungskapazitäten bzw. Enzymaktivitäten der Cytochrome P450 eine starke

Variabilität aufweisen. Z. B. sind bereits die Unterschiede, die zwischen Zelltypen in ein und demselben Organismus bestehen (also z. B. Lungenfibroblasten, Lymphozyten oder Hepatozyten) oft sehr groß. Auch bei Säugerzellen, z. B. auch denen des Menschen, ist ein genetischer Polymorphismus der Cytochrome P450 bekannt, der sogar zu relativ starken individuellen Unterschieden führen kann. Um also die artspezifischen Unterschiede der Enzymaktivitäten und der damit verknüpften Sensibilitäten für Gentoxizität zwischen Fisch- und Säugerzellen zu beschreiben, wäre wohl eine sehr detaillierte Betrachtung der Literatur und neue Vergleichsversuche unter diesen Gesichtspunkten notwendig. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten zu indirekten Gentoxinen und deren Metabolisierung in Fischzellen lassen jedenfalls bisher keine wesentlichen verallgemeinerbaren Unterschiede zu Säugerzellen erkennen.

4.3.2 DNA-Schädigungskinetiken und DNA-Reparatur-Inhibition

4.3.2.1 Zu den Kinetiken von DNA-Schadensentstehung und -Rückgang

Über die Ermittlung einer geeigneten Expositionszeit hinaus ließen sich aus den Experimenten zum zeitlichen Verlauf der DNA-Schäden Informationen über die zellbiologischen Mechanismen und die biologische Relevanz von DNA-Schäden in den betreffenden Zellen gewinnen. Dabei lassen sich die auftretenden Fragen zwei Themenkomplexen zuordnen: 1) der Entstehung und 2) dem Rückgang der DNA-Schäden.

In den NQO-Experimenten zeigte sich, dass die Strangbrüche innerhalb der ersten Stunde rasch zunahmen. Die Abnahme folgte dann nach einem 2-3 h-Maximum und erreichte nach 15-24 h das Niveau der Negativkontrolle. Es wurde gezeigt, dass die Entstehungsphase von DNA-Schäden hier hauptsächlich in den ersten 2 h liegen musste.

4.3.2.2 Zur Zunahme/Entstehung der DNA-Schäden

NQO wird manchmal als direkt gentoxisches Agens bezeichnet und so überrascht die gezeigte schnelle Zunahme der DNA-Strangbrüche zunächst nicht. NQO bedarf jedoch - genauso wie sogenannte indirekt gentoxische Stoffe - metabolischer Umwandlungsschritte, bevor es mit der DNA reagieren kann (genaue Erläuterungen dazu im Kapitel 4.2.1.1 zu NQO). Die Bezeichnung "direkt gentoxisch" wird möglicherweise manchmal verwendet, weil die Enzyme, die zur gentoxischen Aktivierung von NQO führen, ubiquitär bei Pro- und Eukaryonten vorhanden sind und die Wirkung oft wie eine direkte Folge der Behandlung erscheint, wogegen dies für die sogenannten "indirekten" Mutagene nicht zutrifft. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente lassen darauf schließen, dass die Metabolisierung von NQO, die zur Entstehung von DNA-Schäden führt, offenbar auch in RTG-2-Zellen relativ schnell verläuft. Aus den Experimenten kann man auch insgesamt folgern, dass die RTG-2-Zellen die Metabolisierung der dort gegebenen Menge NQO nach ca. 2 h zum größten Teil, und nach ca. 6 h ganz abgeschlossen hatten. In dieser Zeit hatten sich die DNA-Schäden zwar reduziert, waren aber noch nicht vollständig zurückgegangen. Also überlagern sich hier Entstehung und Rückgang der DNA-Schäden. Wie oben gesagt, waren Schäden erst nach 15-24 h nicht mehr mit dem Comet Assay nachweisbar.

Die Schadensentstehung und -reparatur überlagern sich aber nicht nur zeitlich, sondern auch in ihren Mechanismen, jedenfalls in Bezug auf den Comet Assay. Daher müssen der für NQO bisher bekannte Wirkmechanismus und das Funktionsprinzip des Comet Assay näher betrachtet werden. Dazu sollte man folgende Fragen zur Molekularbiologie der Schäden stellen: Welche Art DNA-Schäden treten auf und wie kommt es zu einer Indikation im Comet Assay?

Wie oben (Kapitel 4.2.1.1 zu NQO) erläutert wurde, führt NQO bzw. einige seiner Metabolite zu Addukten an Purinbasen der DNA, und auch oxidative Schäden sind denkbar, die wiederum zu Addukten oder zum Teil auch direkt zu Strangbrüchen führen können. Der Comet Assay kann jedoch Addukte nicht direkt detektieren, sondern nur Strangbrüche und alkali-labile Stellen. Die detektierten Strangbrüche können also hauptsächlich auf folgenden Mechanismen beruhen:

- 1) auf alkali-labilen Addukten, und - ebenfalls alkali-labilen - AP- (apurinischen/apyrimidinischen) Stellen,
- 2) auf oxidativen bzw. radikalischen Strangbrüchen und
- 3) auf Einschnitten durch DNA-Reparaturenzyme (Endonukleasen) an den adduzierten Stellen.

Die Experimente zum Schadensverlauf und zur Inhibition der DNA-Reparatur mit Aphidicolin (APC) (3.3; Nehls & Segner 2005) sollten helfen, diese Möglichkeiten an RTG-2 Zellen zu untersuchen und somit zu verstehen, wie eine positive Reaktion im Comet Assay zustande kommt. Zusammen mit dem aus der Literatur Bekannten werden diese Möglichkeiten hier diskutiert.

4.3.2.3 Zur Abnahme und Reparatur der DNA-Schäden und den Experimenten mit Aphidicolin (APC)

APC als ein Inhibitor der DNA-Polymerasen α , δ und ϵ (Ikegami et al. 1978, Hjertvik et al., 1998) verhindert die DNA-Neusynthese, die - neben der DNA-Replikation vor der Mitose - auch während der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) benötigt wird. Die NER besteht aus den Schritten Inzision, Exzision, Resynthese und Ligation, jeweils vermittelt durch DNA-Endonukleasen, -Exonukleasen, -Polymerasen und -Ligasen (Alberts et al. 1994, S. 248). DNA-Veränderungen wie z. B. relativ große ("bulky") Moleküladdukte (siehe auch Erläuterungen zum Wirkmechanismus von NQO, 4.2.1.1) an den Nukleotiden werden mitsamt einiger sie umgebender Nukleotide (z. B. 27-29) "weiträumig" herausgeschnitten, daher spricht man auch von "long patch repair".

Werden die Lücken nicht geschlossen ("rejoining"), weil die Polymerase durch APC gehemmt ist, entsteht eine Anhäufung von "incomplete repair sites", die im Comet Assay ebenso wie sonstige Strangbrüche nachweisbar sind. Der Effekt solcher Anhäufung von "incomplete repair sites" wurde für NQO, UV-C-Strahlung, BaP und DMBA (Dimethylbenzantracen) an der Humanzelllinie MRC5 im Comet Assay gezeigt (Speit & Hartmann 1995) und für UV-C-Strahlung an HeLa-Zellen (Gedik et al. 1992). Fehlt die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), so hat APC keine steigernde Wirkung auf die DNA-

Migration im Comet Assay, das ergaben z. B. Experimente mit der *Xeroderma pigmentosum*-Zelllinie XP5 (Speit & Hartmann 1995).

Da der Rückgang des DNA-Schadens mit Aphidicolin (APC) im hier vorliegenden Fall über 8 h vollständig hemmbar war, könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dafür sprechen, dass bei RTG-2-Zellen die Reaktion im Comet Assay - wie bei den Säugerzellen von Speit & Hartmann (1995) - zum großen Teil auf Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) beruht. Diese ist wahrscheinlich auf "bulky adducts" zurückzuführen; bei solchen Addukten kann es sich z. B. um dGuo-N2-4AQO und dAdo-N6-4AQO handeln - zumindest wurden diese Addukte bei anderen Zelltypen nach NQO-Behandlung gefunden (s.u.). Somit wäre der Comet Assay wohl auf direkterem Wege ein Indikator für DNA-Reparatur als für DNA-Schädigung - wobei zwischen den beiden Prozessen natürlich ein unmittelbarer Zusammenhang besteht.

Da der Comet Assay schon nach kurzer Expositionszeit mit NQO ansprach, scheint der Inzisionsschritt durch Endonukleasen in RTG-2-Zellen relativ schnell vonstatten zu gehen. Eine weitere mögliche Folgerung ist eine Strangbruchentstehung durch spontanen Zerfall instabiler Addukte oder direkte Brüche durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), d. h. oxidativen Stress. Darauf folgend sind die Zellen offenbar über mehrere Stunden mit der DNA-Resynthese und Ligation "beschäftigt". Die in den Experimenten erreichte Steigerung der Strangbruchrate durch APC gegenüber nur-NQO-behandelten RTG-Zellen (2 h-Experimente) ist die Menge der Strangbrüche, die sonst (ohne APC) während dieser Zeit schon wieder repariert worden wäre. Bei ausführlicherer Untersuchung wäre hier die Suche nach Wegen zur Quantifizierung interessant.

Durch Inhibitionsversuche, wie sie hier angestellt wurden, kann aber die Schadensentstehung nicht vollständig aufgeklärt werden, da APC ja in den Prozess eingreift, *nachdem* offene Stellen im DNA-Strang bereits entstanden sind. Bei Speit & Hartmann (1995) werden neben den "incomplete repair sites" auch AP- (apurinische/apyrimidinische) Stellen erwähnt und über NQO ist bekannt, dass es einen instabilen NQO-Addukt bildet (Ikenaga & Takebe 1981) und zudem oxidative Schäden erzeugen kann (siehe auch Kapitel zu NQO, 4.2.1.1). Somit könnten neben NER-Reparaturenzymen also auch diese anderen Einwirkungen auf die DNA zu den im Comet Assay nachgewiesenen Strangbrüchen geführt haben.

Genauere Rückschlüsse als auf die Schadensentstehung können auf den *Rückgang* der Strangbrüche, also die Reparatur, angestellt werden: DNA-Polymerasen, die nicht durch APC gehemmt werden, scheinen beim NQO-Schaden in RTG-2-Zellen eine nur geringe Rolle zu spielen, da sonst die Hemmung nicht so weitgehend wäre. Mit anderen Worten: Spezifität von APC vorausgesetzt, scheinen andere, von der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) verschiedene Reparaturmechanismen, z. B. Basen-Exzisionsreparatur (BER), nur eine geringere Rolle zu spielen. Ob aber die Spezifität von APC für die NER wirklich streng zutrifft, müsste wiederum genauer untersucht werden. APC wurde ursprünglich als Inhibitor der mitotischen DNA-Replikation bei Seeigel- und Seestern-Oozyten und -Embryos entdeckt, wobei z. B. die DNA-Polymerasen β und γ *nicht* gehemmt wurden (Ikegami et al. 1978. Gerade die - nicht gehemmte - DNA-Polymerase β wird als ein Basen-ER-Enzym vermutet (Hjertvik et al., 1998) und hätte in den Experimenten mit

RTG-2-Zellen dann zur Reparatur führen können, wenn sie bei diesen vorhanden gewesen wäre. Dies wurde aber nicht beobachtet. Dass in der vorliegenden Arbeit die Hemmung vollkommen erschien, bekräftigt die Folgerung, dass z. B. BER nicht beteiligt zu sein schien: Es bleibt also wahrscheinlich, dass die Nukleotid-ER hier eine wichtige Rolle bei der Reparatur der Schäden und vielleicht auch bei der Entstehung der indizierten Strangbrüche zu spielen scheint.

Um die sich überlagernden Prozesse der Metabolisierung (Toxifizierung und Detoxifizierung), Addukt- und Strangbruchentstehung und verschiedener möglicher Reparaturmechanismen genauer zu trennen, bieten sich verschiedene weiterführende Versuche an. Dabei könnte z. B. die Entstehung bestimmter Metabolite verfolgt oder inhibiert werden. Auch sollte für NQO geklärt werden, inwieweit der sowohl bei Säugerzellen als auch bei *E. coli* gefundene instabile NQO-Addukt (Ikenaga & Takebe 1981) und außerdem eventuelle oxidative DNA-Schäden zu den Strangbrüchen beitragen. Experimente könnten hier mit dem Inhibitor Dicoumarol (hemmt die DT-Diaphorase, siehe Kapitel zu NQO, 4.2.1.1) unternommen werden, und oxidierte Basen könnten im Comet Assay mit Hilfe aufgereinigter BER-Enzyme (z. B. FPG = Formamido-Pyrimidin-Glycosylase oder 8-Hydroxyguanin-Glycosylase; Will et al. 1998; Collins et al. 1997) detektiert werden. Bisherige Versuche unserer Arbeitsgruppe (Nehls & Segner 2001) an RTG-2-Zellen mit Dicoumarol zeigten, dass nur ein kleinerer Anteil der gesamten NQO-Reduktion vom Enzym DT-Diaphorase abhängig war. Dies lässt die Folgerung zu, dass AP-Stellen durch instabile Addukte und/oder oxidativer Stress hier einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an der Entstehung der SSBs haben könnten (siehe auch 4.2.1.1 und 4.3.1.2).

Zur Klärung, ob hier wirklich ausschließlich NER oder auch andere Arten der DNA-Reparatur (z. B. BER) vorliegen, könnten weitere Versuche unternommen werden. Durch Versuche mit dem neutralen Comet Assay im Vergleich zum alkalischen könnte zunächst festgestellt werden, welcher Anteil an Doppelstrangbrüchen besteht. Zur Untersuchung des Anteils der BER böten sich Versuche mit dem BER-Inhibitor Methoxyamin und/oder Kühlung an (Bock et al. 1998). Versuche mit ionisierender Strahlung wären ebenfalls sinnvoll, da diese Einzel- und Doppelstrangbrüche erzeugt und anschließend DNA-Reparatur hervorruft (Singh et al. 1988; Olive et al. 1990; Lankinen et al. 1996), die aber nicht vom Typ der Nukleotid-Exzisionsreparatur ist (Harbach et al. 1989). Gerade für NQO wird nämlich ein gewisser Anteil "x-ray type repair" berichtet (Ikenaga & Takebe 1981), vermutlich zurückzuführen auf die AP-Stellen, die durch den instabilen NQO-Addukt zurückbleiben. So könnten die Reparaturfähigkeiten der Zelle und die Spezifität des Schädigungsmusters von NQO genauer eingegrenzt werden. Auch Versuche mit der neutralen Version des Comet Assay könnten weiterführen, da dabei vorwiegend Doppelstrangbrüche (DSBs) detektiert werden, während Einzelstrangbrüche (SSBs) weniger ins Gewicht fallen.

4.3.2.4 Der Comet Assay als Methode zur Untersuchung von DNA-Reparatur?

Da der Comet Assay zu einem wohl relativ großen Teil auch ein Indikator für DNA-Reparatur ist, kann er auch als Methode zur Untersuchung von DNA-Reparatur eingesetzt werden. Tatsächlich zeigen dies die Experimente dieser Arbeit (publiziert in Nehls & Segner 2005) und die in den folgenden Abschnitten genannten Arbeiten, wo der

Comet Assay bereits zur Untersuchung zeitlicher Verläufe von DNA-Schäden und auch von DNA-Reparatur herangezogen wurde. Wiederum sind hierbei die relativ universelle Anwendbarkeit bei verschiedenen Zelltypen und die relativ große Praktikabilität und Sensitivität hervorzuheben. Dies sind wohl auch Vorteile des Comet Assay gegenüber dem - ebenfalls Reparatur anzeigenden - UDS-Test (s. 4.5.1 bzw. Anhang 5). Allerdings bestehen beim Comet Assay - wie oben erläutert - auch andere mögliche Ursachen für die DNA-Strangbrüche, die eine positive Reaktion bewirken, während sich der UDS-Test auf den Einbau von Nukleotiden beschränkt. Für reparaturspezifische Versuche mit dem Comet Assay sollte daher durch entsprechende Vor- oder Parallelversuche (z. B. mit dem UDS-Test) bereits Kenntnis über den Anteil der DNA-Reparatur an den angezeigten Strangbrüchen bestehen. Unter dieser Voraussetzung könnten dann die Vorteile des Comet Assay in Bezug auf Praktikabilität zum tragen kommen.

Auch könnten für spezifische Untersuchungen der DNA-Reparatur im Comet Assay parallel zu Strangbrüchen spezifische DNA-Schäden und deren Rückgang mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern detektiert werden (wie z. B. bei Sauvaigo et al. 1998: Immunfluoreszenz gegen Cyclobutan-Pyrimidindimere; oder bei Fadlallah et al. 1994: Ultraimmunzytochemie gegen O6-Methylguanin-Addukte, hervorgerufen durch DMNA). Neben Versuchen mit Reparaturinhibitoren wie APC oder auch 3-Aminobenzamid (z. B. Hjertvig et al. 1998) bieten sich Untersuchungen an reparaturdefizienten Zellen wie Xeroderma-Pigmentosum-Zellen u.a. an. Weitere zu untersuchende Faktoren, die sich auf die Reparaturkapazität der Zelle auswirken könnten, sind der Nukleotidpool (z. B. diskutiert in Collins et al. 1997; Walton et al. 1983) und evtl. auch die DNA-Menge in der Zelle.

4.3.2.5 Literaturvergleich von Schädigungskinetiken bei Fischzellen und anderen Zelltypen

Ein Aspekt, der für den Comet Assay als Biotest wichtig ist, ist der Vergleich mit anderen Zelltypen, vor allem den gebräuchlicheren Säugerzellen. In Bezug auf die DNA-Schädigungs- und Reparaturkinetiken gibt es folgende Literaturdaten:

Aspekte des zeitlichen Verlaufs von DNA-Schädigung und -Reparatur wurden bisher hauptsächlich an Säugerzellen untersucht (Untersuchungen mit dem Comet Assay: Green et al. 1992; Floyd & Cassoni 1994; Singh et al. 1988 ; 1990; 1991; Bock et al. 1998; Collins et al. 1997; Gedik et al. 1992; Sauvaigo et al. 1998; Speit & Hartmann 1995; Olive et al. 1990).

Direkte Untersuchungen zur DNA-Reparatur an Fischzellen sind rar, es finden sich jedoch einige Anwendungen des UDS-Tests (UDS = Unscheduled DNA Synthesis, entspricht dem Oberbegriff "Exzisionsreparatur", wobei vor allem die Nukleotid-, aber auch Basen-Exzisionsreparatur eine Rolle spielen): Dort wurde der Einbau von radioaktivem ^3H -Thymidin in die DNA als Antwort auf gentoxische Proben gemessen. NQO wurde an BB-Fischzelllinien (Ali et al. 1993), bzw. Fisch-Primärhepatozyten von *Opsanus tau* (Kelly & Maddock 1985) bei Expositionszeiten von 18 bzw. 6 h als Positivkontrolle benutzt. Die Fischzelllinien zeigten signifikante UDS-Reaktionen und somit DNA-Reparatur, jedoch fielen diese Reaktionen wohl geringer aus, als in Ratten-Hepatozyten. Eine UDS-Reparaturstudie, in der die Fischzelllinien RTG, RTO, CH, FHM

direkt mit den Säugerzelllinien CHO und HF verglichen wurden (Walton et al. 1983), zeigte nach ca. 3 h (keine Angabe, ob von Beginn oder Ende der dortigen 3 h-Exposition) ein Reaktionsmaximum, danach einen schnellen Abfall während ca. 16-20 h. Dies entsprach also etwa den Versuchen der vorliegenden Arbeit. Eine zweite, langsamere Phase der Reparatur/Erholung schloss sich an, bis nach ca. 80 h das Kontrollniveau erreicht wurde. Das Reaktionsmaximum der Fischzelllinien fiel geringer aus als das der Säugerzellen, lag aber auch bei CHO-Zellen/NQO relativ niedrig; der Rückgang auf Kontrollwerte war bei RTG/MNNG-Exposition ($1 \mu\text{mol/l}$) auch nach 80 h noch nicht abgeschlossen, während die zweite Reparaturphase nach NQO-Behandlung ($1 \mu\text{M}$) etwa deckungsgleich mit HF und CHO verlief (Walton et al. 1983). Ein biphasischer Rückgang von DNA-Addukten wurde auch bei Primärhepatozyten von *O. mykiss* nach Diethylnitrosamin-Behandlung *in vivo* festgestellt (Fong et al. 1988). Die Addukte nahmen während der ersten 6 h zu, wurden während 12 h schnell und danach (12-96 h) wesentlich langsamer abgebaut.

4.3.2.6 Persistenz von DNA-Schäden

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass DNA-Schäden über längere Zeit in der Zelle persistieren können. Eine solche Persistenz wurde anhand des Nachweises von NQO-Addukten bei *Mytilus galloprovincialis* mit der ^{32}P -Postlabeling-Methode deutlich demonstriert (Harvey & Parry 1998): Nach 24-stündiger Exposition *in vivo* an 50 mg/l NQO wurde ein Schadensmaximum 1 d später erreicht. Ein Rückgang des Schadens zeigte sich nach 2 d, jedoch waren nach 30 d noch 3 - 6,6 % des Adduktmaximums vorhanden, nach 56 d noch ca. 0,3 %. Offensichtlich werden im Allgemeinen nicht alle DNA-Läsionen auf einmal erkannt und repariert, sondern nach der ersten intensiven Reparaturphase verbleiben Schäden, die nur allmählich und evtl. unvollständig repariert werden (biphasische Reparatur). Ein weiteres Beispiel für solche Schäden sind durch H_2O_2 -Behandlung oxidierte DNA-Basen, die im Comet Assay bei HeLa-Zellen in großer Anzahl nachgewiesen werden konnten, indem die DNA (nach dem Lyseschritt) mit Basenexzisionsenzymen behandelt wurde, die spezifisch solche Basen herausschneiden. So konnte z. B. die oxidierte Base 8-OH-dG (= 8-Hydroxyguanin) mit dem Enzym FPG (Formamido-Pyrimidin-Glycosylase) aus *E. coli* nachgewiesen werden (Collins et al. 1997). Ohne die Enzymbehandlung waren die oxidierten Basen - oder besser gesagt deren Reparatur - zum gleichen Zeitpunkt (4 h Postexposition) kaum noch nachweisbar.

In Blut- und Leberzellen von Mäusen wurde nach Benzol-Exposition *in vivo* festgestellt, dass die hervorgerufenen DNA-Schäden (Comet Assay) nach 4-wöchiger Exposition in geringerem Maß zurückgingen (1 oder 2 d Postexposition), als nach nur 5-tägiger Exposition (Plappert et al. 1994), was für eine unvollständige, mit der Zeit erschöpfende oder fehlerhaft werdende DNA-Reparatur spricht. Die bleibende Schädigung und höhere Empfindlichkeit nach chronischer Exposition ist wohl ein generelles Phänomen bei Wirbeltieren, das auch in ganz anderen Fällen, z. B. bei ehemaligen Rauchern, beschrieben ist.

Die weiter oben genannten Untersuchungen von Walton et al. (1983) zeigten ungefähr gleiche Sensitivität für NQO und UV-Strahlung, aber eine geringere Reaktionsstärke und längere Persistenz von Schäden bei Fischzellen gegenüber Säugerzellen im UDS-Test. Möglicherweise bedeutet das, dass die DNA-Reparatur bei Fischzellen weniger effektiv

als bei Säugerzellen ist. Man kann darüber spekulieren, ob in einem solchen Fall eine besondere Gefährdung von Fischen durch gentoxische Kontaminanten im Vergleich zu Säugern vorliegen könnte. Durch die Experimente wurde aber nicht eindeutig geklärt, ob in Säugern und Fischen tatsächlich der gleiche Primärschaden (z. B. Menge der Addukte) vorlag. Die metabolische Aktivierung und die DNA-Reparatur kann sich in den unterschiedlichen Zelltypen so stark unterscheiden, dass keine solchen Aussagen gemacht werden können. Sowohl bei anderen Gentoxinen als auch bei NQO selbst sind diesbezüglich Unterschiede selbst zwischen nahe verwandten Zelltypen nachgewiesen worden. Aflatoxine werden z. B. bei Fischen stärker aktiviert als bei Säugern (Bailey et al. 1996). Und selbst zwischen den Zelllinien RTG-2 und RTL-W1, die der gleichen Spezies entstammen, bestehen metabolische Unterschiede und möglicherweise sogar unterschiedliche Rollen gleicher Enzyme (DT-Diaphorase) bei der gentoxischen Aktivierung von NQO (Nehls & Segner 2001).

Wenn nicht feststeht, ob Fischzellen vielleicht einen geringeren Primärschaden an der DNA bei gleicher Schadstoffdosis aufweisen, kann auch die Behauptung, dass eine geringere DNA-Reparatur bei vorläge, noch nicht endgültig akzeptiert werden. Außerdem sollten ähnliche Vergleichsversuche öfter wiederholt werden, um die These zu untersuchen. Und was die Folgen betrifft, so ist die Manifestation von DNA-Schäden als Mutation vom Durchlaufen der Replikationsphase des Zellzyklus abhängig. Und auch hier müssten die diesbezüglichen Unterschiede der betroffenen Zelltypen erst untersucht werden.

4.3.2.7 Bedeutung der DNA-Reparatur für die biologische Relevanz des Tests

Die DNA-Reparatur ist ein wichtiger und komplexer Schutzmechanismus der Zellen, der berücksichtigt werden muss, wenn man die Frage der biologischen Relevanz der DNA-Schäden beantworten will. Der Test-Endpunkt "DNA-Strangbrüche und AP-Stellen", welcher mit dem Comet Assay detektiert und angezeigt wird, zeigt zunächst sehr empfindlich gentoxische Belastungen an, das Risiko einer manifesten Schädigung wird durch die Reparaturprozesse aber sicherlich stark verringert. Das tatsächliche Risiko kann wohl nur in Kombination mit Kenntnissen der DNA-Reparaturkapazitäten, der Metabolisierungskapazitäten, durch empirische Korrelationen mit Mutationen und schließlich mit *in vivo* gefundenen pathologischen Veränderungen eingeschätzt werden.

Die mit dem Comet Assay angezeigten DNA-Strangbrüche sind auch nicht einheitlich zu beurteilen, sondern in Abhängigkeit von der jeweiligen gentoxischen Chemikalie und deren Metabolisierung. Bei Adduktbildnern resultieren die Strangbrüche wohl zu einem großen Teil aus DNA-Reparaturstellen, aber auch aus AP-Stellen, welche z. B. instabile Addukte repräsentieren. Es ist bekannt, dass Addukte, die über eine oder mehrere Phasen des Zellzyklus bestehen, zu Basen-Fehlpaarungen und damit zu manifesten Mutationen führen können. Dabei gibt es unterschiedlich gefährliche Addukte. Über solche Unterschiede wird aber mit einem unmodifizierten Comet Assay nichts ausgesagt. Wie der Abschnitt 4.3.2.6 zeigte, persistieren DNA-Schäden durchaus zu einem Teil in den Zellen und stellen damit ein wahrscheinlich ernsthaftes Risiko für die Zelle/den Organismus dar, da es wahrscheinlich ist, dass die geschädigte DNA mehrere Zellzyklen durchläuft. Auch Fong et al. (1988) sahen einen wahrscheinlichen Zusammenhang zwischen der Persistenz der durch Diethylnitrosamin (DEN) hervorgerufenen Addukte

und der hohen Inzidenz von Lebertumoren bei DEN-behandelten Regenbogenforellen. Generell könnten ergänzende Mutations- und Karzinogenitätstests weiterhelfen, die Relevanz solcher persistenten Schäden näher zu bestimmen. Nicht-akute Schäden haben sicher auch eine besondere Bedeutung für die Anwendung des Comet Assay im Biomonitoring, wo auch mit chronischen oder intermittierenden Expositionen in belasteten Gebieten bzw. Gewässern zu rechnen ist.

4.3.2.8 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen zu Schädigungskinetiken und DNA-Reparatur-Inhibition

Mit den Experimenten zur Kinetik des DNA-Schadensverlaufes wurde zunächst gezeigt, dass die günstigste Expositionszeit für NQO und RTG-2-Zellen für einen praktikablen Kurzzeit-Test bei 2 h lag (s. 4.1.4).

Die in der Elektrophorese beim Comet Assay verursachte DNA-Migration im Gel beruht auf Strangbrüchen, die auf unterschiedliche Arten gentoxischer Schäden zurückgehen können. Neben direkt verursachten Strangbrüchen und alkali-labilen Stellen kann auch ein - je nach gentoxischer Substanz - relativ großer Anteil auf Einschnitte durch DNA-Reparaturenzyme (Endonukleasen u.a.) zurückzuführen sein. Damit hängt das Ergebnis des Comet Assay auch von DNA-Reparaturprozessen ab. Die hier diskutierten Experimente mit APC lassen vermuten, dass dies bei der Exposition von RTG-2-Zellen an die Substanz NQO der Fall war. Die Strang"bruch"entstehung selbst könnte hier zu einem mehr oder weniger großen Teil, möglicherweise auch vollständig, auf Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) zurückgehen. In einem solchen Fall wäre der Comet Assay als "Indikatortest für NER" anzusehen. Um dies aber nachzuweisen, wären Experimente mit Reparaturinhibitoren notwendig, die ansetzen, *bevor* die DNA eingeschnitten wird, also Inhibitoren von Endo- und Exonukleasen. Solange solche Experimente nicht vorliegen, ist es immer noch möglich anzunehmen, dass andere Mechanismen die Strangbrüche verursachen: nämlich alkali-labile Addukte oder oxidative/radikalische Strangbrüche.

An den Tests zum zeitlichen Verlauf der Schädigung fällt auf, dass die Metabolisierung von NQO (siehe 4.2.1.1) offenbar sehr schnell und mit hohem Stoffumsatz abzulaufen scheint. Auch die DNA-Reparatur setzt offenbar sehr schnell ein. Bei Erreichen des Reaktionsmaximums ist bereits ein Teil der Schäden repariert. Sollten - wie oben gemutmaßt - die Strangbrüche sogar *hauptsächlich* durch DNA-Nukleotid-Exzision verursacht sein, dann müsste die DNA-Reparatur unmittelbar nach der Primärschädigung einsetzen, denn die Schädigungskinetik zeigt einen schnellen Anstieg (s. 3.3.2).

Berichte, wonach Fischzellen eine weniger effektive Reparatur als Säugerzellen besitzen, wären dann nicht uneingeschränkt zu akzeptieren. Die oben genannten Untersuchungen anderer Autoren (4.3.2.5) weisen eventuell auf ein geringeres Schadensmaximum und einen langsameren Rückgang der DNA-Schäden bei Fischen hin, aber ob die Unterschiede relevant sind, bleibt zunächst fraglich. Die Reaktion der Fischzellen gegenüber dem DNA-Polymerase Inhibitor APC (auch veröffentlicht in Nehls & Segner 2005) erschien ähnlich der Reaktion, die auch Säugerzellen zeigten (vgl. Speit & Hartmann 1995). Es muss aber hier wiederum berücksichtigt werden, dass durch Experimente mit APC nur Aussagen über die ersten Teilschritte der DNA-Reparatur gemacht werden können. Generell sind die zelltypspezifischen Unterschiede in

vorangehenden Prozessen (Metabolisierung) und der DNA-Reparatur selbst bislang nicht ausreichend geklärt. Auch sollten die hier angestellten Experimente durch eine größere Anzahl von Versuchswiederholungen untermauert werden.

Die biologische Relevanz der im Comet Assay angezeigten Reaktion wird einerseits dadurch "entschärft", dass ein großer Teil der angezeigten Schäden wieder zurückgeht, andererseits bedeutet eine negative Reaktion nach Verstreichen einer gewissen Zeit nicht, dass wirklich keine Schäden (Addukte, Mutationen) mehr bestehen.

4.3.3 Mögliche Störfaktoren: Zytotoxizität und Apoptose

4.3.3.1 Vorbemerkungen zu unspezifischen Effekten

Ein Problem, das sich störend auswirken kann, sind falsch positive Testergebnisse. Dies sind Testergebnisse, die zwar positiv sind, jedoch nicht die eigentlich erwartete spezifische Wirkung widerspiegeln. Falsch negative Ergebnisse bedeuten dagegen ein Nichtansprechen des Tests trotz vorhandener Wirkung. Falsch positiv ist ein Testergebnis immer in Bezug auf einen definierten Endpunkt. Z. B. wäre ein Testergebnis in einem Test, der DNA-Strangbrüche als Folge von Gentoxizität in der lebenden Zelle anzeigen soll, falsch positiv, wenn die Strangbrüche erst nach dem Zelltod durch unspezifische DNAsen der zerfallenden Zelle entstanden wären. Würde man den gleichen Test zur Anzeige von karzinogener Wirkung benutzen (weil eine Korrelation besteht), so könnte man alle positiven Testergebnisse als falsch positiv bezeichnen, bei denen in Folge der Exposition gar kein Krebs entstanden ist. Denkbare falsch positive Testergebnisse können durch unspezifische Nebeneffekte der Probe entstehen, wobei die unerwünschten Endpunkte durchaus in reproduzierbarem Zusammenhang mit dem gewünschten Endpunkt stehen können. Im Folgenden sollen die möglichen Auswirkungen von Zelltod (Nekrose) und Apoptose auf den Comet Assay diskutiert werden.

4.3.3.2 Zytotoxizität als Störfaktor im Comet Assay

Der alkalische Comet Assay detektiert alle DNA-strangbrechenden Wirkungen, jedoch ist es ausschließlich von Interesse, *primär* strangbrechende Wirkungen in einem ansonsten möglichst intakten zellulären Kontext nachzuweisen. Eine Situation, wo dies nicht der Fall ist, ist Zytotoxizität, welche die DNA-Schädigung erst nach sich zieht. Zytotoxizität verursacht den (irreversiblen) Zelltod, der unterschiedliche Ursachen haben kann und verschiedene Folgen nach sich zieht. Als Folge können z. B. positive Ergebnisse in Kurzzeit-Gentoxizitätstests auftreten (siehe z. B. Miltenburger 1993). Ist die Zelle geschädigt und stirbt ab, so können unkontrollierte Prozesse wie die Freisetzung von DNA-Hydrolasen aus den Lysosomen DNA-Strangbrüche verursachen. Außerdem führen membranschädigende Substanzen (Angriff der Kernhülle) zu DNA-Strangbrüchen (Bradley et al. 1987). Auch oxidativer Stress kann durch Xenobiotika in Gang gesetzt werden (Fry 1982). Die oxidativen Prozesse besitzen eine "Breitbandwirkung" (Reaktion mit DNA, Proteinen und Membranen), sodass sowohl direkte als auch unspezifische, "zytotoxische DNA-Schädigung" auftreten kann. Die Grenze zwischen Zytotoxizität und Gentoxizität verläuft also nicht immer scharf. Zytotoxizität muss außerdem anscheinend nicht in jedem Fall Gentoxizität zur Folge haben: Mitomycin C war z. B. bei Henderson

et al. (1998) nicht gentoxisch, obwohl die Zytotoxizitätsschwelle bereits überschritten war.

Um die Nicht-Gentoxine von spezifischen Gentoxinen zu unterscheiden, sollte eine Kombination von Zytotoxizitäts- und Gentoxizitätstest eingesetzt werden (Henderson et al. 1998), und dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem FDA/EtBr-Test getan. Im allgemeinen werden in Zytotoxizitätstests bestimmte typische Folgereaktionen (Endpunkte) des Absterbens von Zellen als Indikatoren genutzt, z. B. die Membranschädigung oder der Zusammenbruch der metabolischen Aktivität. Die hier angewandte Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid-Doppelfärbung (FDA/EtBr-Test, Dankberg & Persidsky 1976) ist eine sehr schnelle und einfache Methode. Mit diesem Test wird die Intaktheit der Zellmembran überprüft - Der Test ist also primär ein Membrantest. (Funktionsprinzip: Acetat wird durch Esteraseaktivität lebender Zellen vom Fluorescein abgespalten; Letzteres kann die Membranen intakter Zellen nicht mehr durchdringen und bleibt dort eingeschlossen. EtBr dringt dagegen nur in Zellen mit geschädigter Membran.).

Der hier verwendete FDA/EtBr-Test erwies sich als schnell durchführbar und wenig aufwendig und konnte mindestens akute und stark zytotoxische Effekte detektieren. Die Funktion der Abgrenzung Gentoxizität/Zytotoxizität hatte der Test damit erfüllt.

Mit der routinemäßigen begleitenden Zytotoxizitätstestung wurde hier nur in seltenen Fällen Zytotoxizität festgestellt. Wenn dies der Fall war (z. B. beim Spittelwasser-Sedimentextrakt F_{ges}), wurde schnell maximale Gentoxizität im Comet Assay erreicht, also *bevor* 100 % der Zellen abgestorben waren. Man könnte also vermuten, dass die gentoxische Schwelle bei zytotoxischer Wirkung eher abrupt überschritten wird und relativ leicht zu bemerken ist. Hier wurde mindestens 70 % Viabilität als Kriterium für nicht zytotoxisch betroffene Zellen angewandt. Dies scheint eine vernünftige Schwelle zu sein: in der Literatur findet man z. B., dass ab einer Viabilität ≤ 75 % DNA-Schädigungen auftreten (Elia et al. 1993). Zytotoxisch verursachte, unspezifische DNA-Schädigungen sollten also in der vorliegenden Arbeit in den zudem meist sehr niedrigen Konzentrationsbereichen weitgehend ausgeschlossen werden können. Wobei dieser Aussage zugrunde gelegt wird, dass hier die mit dem FDA/EB-Test zum Zeitpunkt der Prüfung (gleicher Zeitpunkt wie die Prüfung mit dem Comet Assay) festgestellte Zytotoxizität gemeint ist.

Mit der Testung sofort nach der 2 h-Expositionszeit wurden also keine längerfristigen, später einsetzenden zytotoxischen Wirkungen untersucht (z. B. messbar über die "Plating efficiency"). Dieses Problem stellt sich aber nicht nur hier, sondern genauso bei anderen Kurzzeit-Zytotoxizitätstests, wie dem Trypanblau-Exklusionstest, der ebenfalls Membranschädigung detektiert (verzögerte Zytotoxizität z. B. auch bei Elia et al. 1993). Auch Vorstadien von Membranschädigungen wie das sog. "Blebbing" der Zellmembran können subletal vorkommen, ohne indiziert zu werden (ebenfalls Trypanblautest; Kuchenmeister et al. 1998). Dies könnte auch im FDA/EtBr-Test der Fall sein, wo sich die Zytotoxizität eher als "Alles-oder-Nichts-Reaktion" darstellte, während feinere Abstufungen in der vorliegenden Arbeit nicht vorzukommen schienen. (Zum "Blebbing" ist noch zu sagen, dass dies eher auf ein apoptotisches Absterben der Zelle hindeutet,

was übrigens im Frühstadium nicht durch Zytotoxizitätstests feststellbar ist - mehr dazu siehe unten.)

Eine Zytotoxizitätstestung unseres Labors mit einem Test bei 20-stündiger Expositionszeit ergab für NQO eine Reduktion auf 50 % Viabilität bei 5,55 $\mu\text{mol/l}$ (Nehls & Segner 2001). Diese Zytotoxizitätsgrenze liegt also weit über den Konzentrationen und Expositionszeiten, die in der vorliegenden Arbeit für die Gentoxizitätsprüfung angewandt wurden. Untersuchungen von Hartmann & Speit (1997) und von Hartmann et al. (2001) zum Effekt von Zytotoxizität im FDA/EtBr-Test bzw. Trypanblau-Test auf das Ergebnis im Comet Assay ergaben bei den dort untersuchten Substanzen und Zellen überdies, dass zytotoxische Effekte meist gar keinen Einfluss auf die Gentoxizität hatten.

Der Fall einer Zytotoxizität als Folge von Gentoxizität - also die umgekehrte Ursache-Wirkungs-Folge - wurde hier nicht weiter untersucht. Solche Fälle wären für die biologische Relevanz des Comet Assay von Interesse, sind aber für die reine Diagnose einer gentoxischen Wirkung (hier DNA-Strangbrüche) nicht notwendig.

4.3.3.3 Apoptose als Störfaktor im Comet Assay

Neben der Zell-Nekrose (s. Einleitung, 1.2) kann auch kann der "aktive" Zelltod, die **Apoptose (programmierter Zelltod)**, eine Ursache für DNA-Strangbrüche sein. Bei der Apoptose wird die DNA durch enzymatische Reaktionen vollkommen in kleinste, nukleosomale Fragmente von 180-200 bp zerlegt (Williams 1991, Olive et al. 1993), daher zeigen solche Zellen im Comet Assay maximale DNA-Schädigungen. Die Apoptose ist ein "gewollter" Prozess, mit der sich der Organismus nicht mehr benötigter, nicht funktionaler oder kranker Zellen entledigen kann. Dabei läuft eine zelleigene, gesteuerte Reaktionskaskade ab, sodass die resultierende DNA-Fragmentierung dort im Gegensatz zur Nekrose auf spezifischer enzymatischer Spaltung beruht. Apoptose kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden, wobei auch einige gentoxische Substanzen und womöglich die Genschädigung selbst zu Apoptose führen können. Nach einer Genschädigung kann der Zellzyklus angehalten werden, worauf die DNA repariert oder die Reaktionskaskade der Apoptose gestartet werden kann (Olive et al. 1993, Feng et al. 2011).

Für den Comet Assay wurde gezeigt, dass apoptotische Zellen dort als Comets mit vollkommener DNA-Schädigung erscheinen, die oft eine typische "Hedgehog"- (=Igel)-Form mit kleinem, schwach fluoreszierendem Kopf und großem, diffusen und weit aufgespreiteten oder bauchigen Schweif haben und daher von einigen Anwendern bewusst ausselektiert werden. Weitere gängige Bezeichnungen anstelle von "Hedgehogs" sind: "Ghosts", "Ghost cells", "Clouds", "NDCN - Non Detectable Cell Nuclei". Dieses Ausselektieren kann allerdings sehr willkürlichen Charakter haben und ist daher sehr kritisch zu betrachten, wenn die Apoptose nicht speziell verifiziert wird. Offenbar können bestimmte nekrotische Zellen im Comet Assay ganz genau so aussehen, wie apoptotische (Tice et al. 2000) und auch sonstige stark gentoxisch geschädigte Zellen können im Normalfall unter dem Mikroskop nicht eindeutig von apoptotischen Zellen auseinandergehalten werden. Bei den Arbeiten, wo der Comet Assay als spezifische Methode zur Apoptose-Detektion verwendet wird, handelt es sich oft um weiterentwickelte, spezielle Anwendungen des Comet Assay (MNCA = "Modified Neutral

Comet Assay" mit Silberfärbung; Kizilian et al. 1999; Wilkins et al. 2002), und es werden parallel weitere Methoden zur Detektion der Apoptose eingesetzt, wie morphologische Kriterien unter Lichtmikroskopie (Kizilian et al. 1999) oder Elektronenmikroskopie (Yasuhara et al. 2003), TUNEL Assay (Large et al. 2002; Wada et al. 2003), Durchflusszytometrie mit oder ohne immunzytochemischer Färbung mit Annexin-V (Olive et al. 1993; Meintières et al. 2003; Yasuhara et al. 2003; Godard et al. 1999) und "Halo" Assay / Diffusion Assay (Meintières et al. 2003; Nigro et al. 2002; Godard et al. 1999).

Die Modifikationen des Comet Assay zur Apoptose-Detektion weisen genau auf die festgestellten kritischen Punkte des normalen Comet Assay bezüglich der Apoptose hin: Der "Halo" Assay ist gewissermaßen ein neutraler oder alkalischer Comet Assay ohne Elektrophorese und der MNCA ist ein neutraler Comet Assay mit permanenter Silberfärbung. Zunächst werden bei den neutralen Methoden nur Doppelstrangbrüche (DSBs) gezeigt, sodass die meisten nicht-apoptotischen DNA-Schädigungen nicht ins Ergebnis eingehen. Weiterhin vermeiden beide Methoden möglichst, dass die sehr kleinen DNA-Fragmente sich diffus im Agarosegel verteilen, "auswandern" oder durch schnelles Ausbleichen der Fluoreszenz optisch verschwinden. Was sich bei erwünschter Apoptose-Detektion als Problem darstellt, also das Verschwinden apoptotischer Comets, könnte in einem Comet Assay, der Gentoxizität detektieren soll - und das ist bisher noch der Normalfall und wurde auch in vorliegender Arbeit beabsichtigt - als Vorteil gelten.

Da in der vorliegenden Arbeit der Anteil apoptotischer Zellen nicht bestimmt wurde, kann leider keine genaue Aussage über deren Anteil in den Versuchsergebnissen gemacht werden. Um zu vermeiden, dass Zellen, die in Wahrheit gentoxisch geschädigt waren, willkürlich als apoptotisch eingestuft wurden, wurden hier keine Zellen von der Auswertung ausgeschlossen. Jedoch sprechen einige Gründe dafür, dass der Anteil apoptotischer Zellen nur gering sein sollte. Zunächst lässt sich sagen, dass in den Versuchen (wie z. B. den Dosis-Wirkungs-Versuchen mit NQO) große Anteile von Apoptose wohl wegen der Comet-Morphologie ("Hedgehogs") aufgefallen wären. Zweitens spricht die Feststellung, dass bei einigen Autoren in der alkalischen Elektrophorese ein mehr oder weniger großer Teil der apoptotischen Comets verloren ging, eher für einen reduzierten Apoptose-Anteil (Meintières et al. 2003; Wada et al. 2003; Godard et al. 1999; nur eine Arbeit spricht von einem geringen Verlust: Rundell et al. 2003). Drittens ist es ein sehr wichtiges Argument, dass in den meisten Fällen nach kurzer Zeit - wie hier nach 2 h Exposition - selten apoptotische DNA-Schäden vorhanden waren, sondern diese oft erst nach 10-20 h oder noch später auftraten (z. B. Olive et al. 1993), vor allem bei niedrigen Substanzkonzentrationen (und das war hier meist der Fall). Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass die Apoptose eine aktive Reaktionskaskade ist, die auch eine Proteinsynthese erfordert (Steinert 1996). Bei Olive et al. (1993) konnte sogar eine zeitliche Trennung von Gentoxizität mit anschließender DNA-Reparatur und dann später einsetzender Apoptose gezeigt werden. Darüber hinaus spricht im Fall von NQO die gezeigte DNA-Reparatur gegen eine Apoptose, da letztere als irreversibel angesehen wird und daher die Reparatur auch schon als Apoptose-Ausschlusskriterium eingesetzt wurde (Rundell et al. 2003).

Der Anteil apoptotischer Zellen in Negativkontrollen lag in Arbeiten anderer Autoren bei verschiedenen Zelltypen z. B. bei 4,5 % (Meintières et al. 2003), 2,36 % (Yasuhara et al.

2003) und ca. 2 % (Kizilian et al. 1999). Bei Substanzexposition konnte der Anteil dann dosisabhängig steigen, auf bis zu 100 % apoptotische Zellen, wobei der alkalische Comet Assay wie gesagt oft geringere Anteile von apoptotischen Zellen zeigte, z. B. 1 % gegenüber 10 % im TUNEL Assay bei Wada et al. (2003) 48 h nach Behandlung mit γ -Strahlung. Obwohl - wie ebenfalls oben gesagt - wahrscheinlich nur ein kleiner Anteil apoptotischer Zellen in den Experimenten der vorliegenden Arbeit vorkam, kann nicht abgeleitet werden, wie hoch dieser Anteil genau ist. Die Apoptose-Induktion ist offenbar sehr substanz- und konzentrationspezifisch. Hinweise auf Apoptose-Induktion durch die hier verwendeten Substanzen finden sich kaum in der Literatur: Bei Meintières et al. (2003) wurde MNNG verwendet, wobei z. B. bei 14,8 $\mu\text{mol/l}$ MNNG bei CTLL-2-Zellen 100 % stark geschädigte "Ghost"-Comets gefunden wurden, wovon 13,5 % apoptotisch waren (die höchste Konzentration von MNNG in der vorliegenden Arbeit lag leicht über 1 $\mu\text{mol/l}$ MNNG). Auch BaP kann nach längerer Expositionszeit Apoptose induzieren, jedoch war in der Untersuchung von Steinert (1996) immer noch der größte Teil gentoxisch verursacht (0,5 $\mu\text{mol/l}$, 5- 30 h Exposition). Bei Micic et al. (2002) konnte nach *in vivo*-Injektion von BaP bzw. NQO in Muscheln zwar DNA-Schädigung mit der alkalischen Filterelution, aber keine Apoptose nachgewiesen werden. Obwohl das wiederum ein Indiz für die gentoxische und nicht apoptotische Wirkung der Substanzen ist, ist ein Vergleich mit der vorliegenden Arbeit kaum möglich.

Ein Argument, das für einen gewissen Anteil von Apoptose im Comet Assay sprechen könnte, ist, dass besonders die frühen Stadien der apoptotischen DNA-Fragmentierung vom Comet Assay detektiert werden können und dass in der Apoptose die DNA-Zerlegung wohl in zwei Schritten stattfindet: Zunächst entstehen Fragmente, die ca. 50 kbp groß sind, und erst in einem zweiten Schritt erfolgt die Spaltung in nukleosomale Fragmente von 180-200 bp. Folglich könnten frühapoptotische Zellen die Versuchsergebnisse der vorliegenden Arbeit durchaus unbemerkt verfälscht haben. Nichtsdestotrotz wird der Anteil vermutlich gering sein.

Insgesamt sollte für die Versuche dieser Arbeit also angenommen werden, dass eine Verwechslung von Apoptose mit Gentoxizität nicht ausgeschlossen werden kann (das durchschnittliche Tail Moment der je 100 Zellen würde steigen) und dass apoptotische Zellen auch zur Varianz der Negativkontrollen beigetragen haben. Die mögliche Verfälschung der Ergebnisse ist aber wahrscheinlich gering. Die getesteten Substanzen sind in den niedrigen Konzentrationsbereichen aus anderen Untersuchungen eher als gentoxisch bekannt. Der Zeitrahmen von 2 h ist sehr kurz, um apoptotische Zellen entstehen zu lassen. Es mag Fälle geben, wo Apoptose über nicht-gentoxische Mechanismen ausgelöst wird, jedoch ist bekannt, dass Apoptose eine Art letzter Ausweg ist, wenn DNA-Schäden nicht repariert werden können. Falls also Apoptose ausgelöst wurde, ist dies in vielen Fällen wohl eine *Folge* von Gentoxizität. Sollte also das Ergebnis durch apoptotische "Comets" verfälscht worden sein, so würde das dennoch nicht vollkommen andere Interpretationen erzwingen, denn es würde auf Gentoxizität beruhen. Das Risiko einer Verfälschung durch Integration aller auswertbaren "Comets" auf dem Objektträger wurde in vorliegender Auswertung geringer eingeschätzt, als bestimmte Zellen aufgrund von ziemlich willkürlichen Kriterien von der Analyse auszuschließen.

4.4 Passives Biomonitoring von Fischen aus der Mosel

4.4.1 Methodisches

Bei der Anwendung des Comet Assay von freilebenden Döbeln (*Leuciscus cephalus*) aus der Mosel zeigte sich, dass die Technik von der bei den Zellkulturen angewandten Methode auf von Döbeln abgenommene Blutzellen gut übertragbar ist, und ein weiteres Mal wurde damit die breite Anwendbarkeit der Methode bestätigt. Über die bloße Übertragbarkeit hinaus wurden Resultate im Biomonitoring erzielt (s.u.) und die Comet Assay-Präparation erfolgreich mit minimalem methodischen Aufwand in einem provisorischen Labor in der Nähe der Probenahmestellen durchgeführt. Dies ist ein wichtiger Aspekt für den Einsatz im *in situ*-Freilandmonitoring. Zu den großen methodischen Vorteilen muss außerdem gezählt werden, dass der Hauptbestandteil von Fischblut - die Erythrozyten (die um 98 % des Blutes ausmachen) - im Gegensatz zu reifen Säuger-Erythrozyten Zellkerne besitzen, sodass das Untersuchungsmaterial schnell und einfach ohne Zentrifugations- oder Reinigungsschritte zugänglich ist. Sind die Blutzellen erst gewonnen, stellen sie sogar ein leichter und schneller zu bearbeitendes Untersuchungsmaterial als Zellkulturen dar. Auch der Aufwand der vorhergehenden Zellkultivierung entfällt.

Dennoch gab es selbstverständlich Faktoren, die spezifisch das Biomonitoring, die lebenden Fische oder die Behandlung der Blutproben betrafen. Von diesen Faktoren wurden einige zur Untersuchung herausgegriffen, so z. B. das Volumen der Blutproben, das bei der Blutentnahme von der Größe der Fische abhängig war (je kleiner der Fisch, desto schwerer war es, ausreichend große Volumina abzunehmen). Mit statistischen Methoden konnte jedoch hier kein Einfluss des Probenvolumens auf die DNA-Schädigung festgestellt werden. Ebenso wenig zeigte die Untersuchung haltbare statistische Zusammenhänge zwischen der DNA-Schädigung und dem Geschlecht oder dem Körpergewicht der Fische. Dabei ergab sich auch die Folgerung, dass wahrscheinlich kein Zusammenhang mit dem Alter der Fische bestand, da das Körpergewicht bei *L. cephalus* eine Funktion des Alters ist (Habashy 1974).

Diese Ergebnisse können als Bestätigung für die Praktikabilität des Comet Assay im Gentoxizitäts-Biomonitoring angesehen werden und versprechen sogar die Möglichkeit weiterer Vereinfachungen: Ein "Pooling" der Daten mehrerer Fische ist ohne Berücksichtigung von Alter, Größe und Geschlecht möglich und bei Bedarf kann sogar schnelles Gentoxizitäts-Monitoring durchgeführt werden, ohne dass die Fische gewogen und auf ihr Geschlecht hin untersucht werden müssen. Damit ergibt sich auch die Möglichkeit, die Methode non-destruktiv (ohne die Fische zu töten) durchzuführen - ein ethischer und naturschützerischer Vorteil (wobei letzterer beim weit verbreiteten Döbel weniger ins Gewicht fiel).

Eine gewisse Vorsicht ist aber gegenüber den hier gewonnenen statistischen Ergebnissen geboten. Liepelt et al. (1995) zeigten an Regenbogenforellen, dass erhöhter Sauerstoffgehalt *in vivo* während 5 h-Exposition DNA-Strangbrüche hervorrufen kann. Forellenerythrozyten können autooxidative Prozesse durchlaufen, die auch die DNA schädigen können (Villarini et al. 1998). Außerdem ist auch das Zell-Alter von Forellenerythrozyten von Bedeutung: Ältere Erythrozyten (innerhalb eines Tieres)

weisen höhere DNA-Schädigungen im Comet Assay als jüngere auf (Moretti et al. 1998). Damit bleibt nach wie vor die Möglichkeit bestehen, dass die Behandlung der Blutproben in einigen Fällen doch einen zusätzlichen DNA-Schaden ausgelöst haben könnte. Luft im Transportgefäß, Wärme- und Lichteinwirkung können vermieden werden. Außerdem ist grundsätzlich ein Einfluss des Verhaltens der Fische vor dem Fang und beim Fang selbst (Aktivität, Stress) nicht auszuschließen. Auch die Frage, ob das Alter der Fische nicht doch eine Rolle spielen kann, sollte in weiteren Untersuchungen mit mehr Daten statistisch überprüft werden, denn einige der hier gefundenen Daten könnten als Hinweise darauf interpretiert werden.

Die erfolgreiche Übertragung der Methode von *in vitro*-Systemen im Labor auf natürliche Systeme von hoher biologischer Relevanz (Organismus bzw. Population) macht Vergleichsversuche zwischen diesen prinzipiell möglich. Im Einzelnen war jedoch die Höhe des Comet Assay-Messparameters "Tail Moment" der Erythrozyten nicht quantitativ (1:1) mit den Ergebnissen der RTG-2- und RTL-W1-Zellen vergleichbar. Die Ursachen dafür lagen in der Durchführung in unterschiedlichen Labors mit unterschiedlicher Ausstattung und leichten methodischen Abweichungen sowie in den unterschiedlichen Zelltypen. Um weiteren Aufschluss über die Aussagefähigkeit zu erlangen und um Spezialanwendungen im Umfeld des Gentoxizitäts-Biomonitoring zu ermöglichen, sollte die Methode systematisch evaluiert werden, d. h., eine Reihe von Umweltgemischen müsste sowohl im Zelltest als auch im *in vivo*-Test miteinander verglichen werden, wie das beispielsweise bei Gagné & Blaise (1997) getan wurde. Dort wurden positive und negative Testergebnisse aus den zu vergleichenden Methoden zueinander in Beziehung gesetzt, wobei mathematische Parameter errechnet wurden: Spezifität, Vorhersagbarkeit (predictive value), Konkordanz und Inzidenz (Gagné & Blaise 1997 dortige Tabelle 1, S. 308).

4.4.2 Zu den Ergebnissen des Biomonitoring

Im Biomonitoring von freilebenden Döbeln ließen sich in den Erythrozyten DNA-Strangbrüche an allen vier getesteten Probestationen nachweisen. Nur die Fische der stromabwärts gelegenen Station "Velle sur Moselle" wiesen signifikant geringere DNA-Schäden als die der übrigen Stationen auf. Wie bereits oben erwähnt, können die im Comet Assay an den Erythrozyten gewonnenen Ergebnisse nicht unmittelbar mit den an Zellkulturen gewonnenen Ergebnissen in dieser Arbeit verglichen werden. Beim Vergleich mit Daten aus anderen Biomonitoring-Untersuchungen an den Flüssen Ain und Rhone (Devaux et al. 1998) kann man jedoch der Station Velle-sur-Moselle ungefähr Kontrollniveau zuordnen, während die anderen Stationen, besonders Eloyes, eine darüber liegende, deutliche DNA-Schädigung aufwiesen.

Zwei andere Biomarker, die EROD-Aktivität, stellvertretend für Cytochrom-P4501A1, und die Acetylcholinesterase (AChE)-Inhibition, wurden im Biomonitoring-Programm gemessen. Dabei konnte die AChE-Inhibition im Fischmuskel mangels Vergleichsdaten nicht eindeutig einem bestimmten Schädigungsniveau zugeordnet werden und zeigte zwischen den Fischen der einzelnen Stationen keine signifikanten Unterschiede (dabei wurde die Abhängigkeit von der Größe der Fische, die bei diesem Parameter gegeben ist, rechnerisch bereits berücksichtigt). So konnten die Daten auch wenig Anhaltspunkte für

das Vorkommen oder die Abwesenheit von Organophosphat- oder Carbamat-Pestizidbelastung aus der Landwirtschaft liefern.

Die EROD-Aktivität in der Leber der Fische unterliegt - neben einer Abhängigkeit von einer Exposition an bestimmte Schadstoffe - natürlicherweise einer Abhängigkeit vom Geschlecht und von der Jahreszeit. Da die Daten hier während der Fortpflanzungsperiode gewonnen wurden, besaßen die Weibchen generell eine geringere EROD-Aktivität als die Männchen. Nach Berücksichtigung dieser Tatsache oder auch bei getrennter Betrachtung der Geschlechter wurde in Bezug auf die Probenahmestationen eine Zunahme der EROD-Aktivität flussabwärts gefunden, wobei im Vergleich zu Kontrolldaten anderer Untersuchungen (Flammarion et al. 1998 Flammarion & Garric (1999) hohe Werte erreicht wurden. So ergab sich also eine gewisse Gegenläufigkeit von Gentoxizität und EROD-Aktivität, und auch bei Betrachtung bestimmter Gruppierungen (s. Ergebnisteil) traten häufiger negative als positive Korrelationskoeffizienten zwischen den beiden Biomarkern auf, die jedoch statistisch nicht signifikant waren.

Die Cytochrom-P450-Aktivität kann, z. B. aus PAHs und weiteren Stoffen, gentoxische Stoffe generieren (Aktivierung indirekter Gentoxine s. 4.2.1, 4.3.1.2). Wegen dieses kausalen Zusammenhangs können prinzipiell Korrelationen erwartet werden, wobei nicht vergessen werden soll, dass die Aktivierung stoff- und enzymespezifisch abläuft, also z. B. CYP1A1 für die Aktivierung von BaP notwendig ist, und dass die hier gemessene EROD-Aktivität auch ausschließlich die CYP1A1-Aktivität widerspiegelt. Zunächst ist hier aber zu beachten, dass Gentoxizität und EROD-Induktion in unterschiedlichen Organen - nämlich im Blut und in der Leber - gemessen wurden. Wenn durch die hepatische CYP1A-Aktivität gentoxische Metabolite erzeugt werden, sind diese wahrscheinlich auch vor allem in der Leber wirksam, bzw. reagieren in der Leberzelle, in der sie gebildet wurden, mit der DNA. Die Blutzellen haben so vermutlich eine geringere Wahrscheinlichkeit, betroffen zu sein, weil räumliche, zelluläre und biochemische Barrieren - wie die Phase-II-Detoxifikation und die Exkretion - zwischen ihnen und der Leber bestehen. Entgegen einer Erwartung fehlende gentoxische Effekte in Erythrozyten könnten also darauf zurückzuführen sein.

In der Literatur finden sich bezüglich der Metabolisierungsfähigkeit von Blut und Leber unterschiedliche Ergebnisse: Die *in vitro*-Versuche von Mitchelmore & Chipman (1998a) weisen eher auf ein Fehlen der Metabolisierung bei Blutzellen von Fischen (*Salmo trutta*) im Gegensatz zu Leberzellen hin. Nitrofurantoin und indirekte Mutagene wie BaP zeigten dort in Blutzellen keine signifikanten Effekte. Kennedy et al. (1991) zeigten, dass Fischblutzellen nur etwa 1 % der Metabolisierungsrate von Leberzellen aufweisen. In der *in vivo*-Situation scheinen aber PAHs durchaus gentoxische Effekte in Fischerythrozyten zu verursachen (Pacheco & Santos 1997; Theodorakis et al. 1994). Bei Malmström et al. (2000) ist der *in vivo*-Effekt nach Injektion von BaP in Flundern bei den Hepatozyten ca. 20-fach höher als in den Leukozyten. Auch müssen bei natürlicher Exposition zunächst einige Barrieren wie Kiemen oder Darm überwunden werden, bevor die Gentoxine ins Blut gelangen können. Z. B. zeigten Flundern, deren Futter indirekte Gentoxine enthielt, nur in den Darmzellen, nicht aber in den Leber- und Blutzellen DNA-Schäden (Nacci et al. 1996). Und vermutlich ist ein DNA-Schaden in Blutzellen von der Biotransformation in der Leber abhängig und kaum auf eigene Metabolisierung zurückzuführen.

Unter der Annahme, dass bei den Döbeln gentoxische Metabolite ins Blut gelangen können, oder dass die Blutzellen (in diesem Fall die Erythrozyten) eine eigene Metabolisierungsaktivität besitzen, sollte als Nächstes der Zusammenhang zwischen CYP450-Aktivität und Gentoxizität betrachtet werden. In der vorliegenden Arbeit war zwar keine eindeutige negative Korrelation nachweisbar, dennoch standen sich eher gegenläufige Werte gegenüber. Für den Zusammenhang liegen auch einige Literaturdaten vor: Eine Erhöhung des CYP450-Induktionsniveaus in der Fisch-Hepatoma Zelllinie PLHC-1 führte nur in geringerem Maße zu einer Erhöhung der Gentoxizität (Smeets et al. 1999). Entsprechende Ergebnisse wurden auch an humanen Hepatozytenkulturen gewonnen (Montheit et al. 1990). Andere Beispiele mangelnder Korrelation wurden bereits unter 4.3.1.2 genannt. Bei Masfaraud et al. (1992) entstanden nach Vorinduktion der CYP-Aktivität durch β -Naphthoflavon in Primärhepatozyten der Regenbogenforelle sogar weniger BaP-Addukte als ohne Vorinduktion. In einem Caging-Versuch mit Forellen in einem Fluss stieg die Gentoxizität geringer als die EROD-Aktivität und konnte im zeitlichen Verlauf sogar zurückgehen (De Flora et al. 1993). Als weiteres Beispiel können noch die Experimente von Ploch et al. (1998) genannt werden, wo eine Fischart mit niedrigerer CYP450-Kapazität mehr BaP-Addukte aufwies als eine nahe verwandte Art mit höherer CYP-Kapazität (dies galt jedoch nicht für Aminoanthracen). Der geringere Anstieg oder Rückgang der DNA-Addukte trotz erhöhter CYP450-Induktion kann wahrscheinlich mit der Aktivität weiterer, detoxifizierender Biotransformationsenzyme der Phase II und der DNA-Reparatur erklärt werden (das vermuten auch Smeets et al. 1999 und Masfaraud et al. (1992)). Die eigenen Experimente an RTG-2- und RTL-W1-Zellen lassen sich dagegen nicht unbedingt in diese Reihe stellen, da hier durchaus Hinweise darauf bestanden, dass eine erhöhte Metabolisierungskapazität auch mit erhöhter gentoxischer Reaktion auf BaP einherging (s. 4.3.1.2, Nehls & Segner 2001). Gewissheit könnte allerdings nur der Dosis-Wirkungs-Vergleich von Gentoxizität und Metabolismus an jeweils einer einzigen Zelllinie bringen, auch unter Berücksichtigung der Expositionszeit. Danach müsste dann mit der *in vivo*-Situation verglichen werden.

Man könnte also das hier vorliegende Ergebnis geringerer Gentoxizität trotz höherer EROD-Aktivität ebenfalls mit einer erhöhten Detoxifikationsaktivität durch Phase-II-Enzyme (ob in Leber- oder Blutzellen) erklären, sodass die progenotoxischen Substanzen durch hohe CYP450-Aktivität zwar vermehrt aktiviert werden, dann aber in noch stärkerem Maße gleich wieder detoxifiziert werden. Vielleicht können Phase-II-Enzyme durch das vermehrte Auftreten gentoxischer Metabolite entsprechend stark induziert werden.

Letztlich darf aber nicht vergessen werden, dass bei der Vielfalt der möglichen Substanzen und Stoffwechselwege die bei den Döbeln gefundene Gentoxizität auch vollkommen unabhängig von EROD-aktivierten Substanzen zustande gekommen sein könnte, während die EROD-Aktivität durch Substanzen induziert worden sein könnte, die keine nennenswerte Gentoxizität verursachen.

Durch die begleitende chemische Analyse wurden einige verdächtige Substanzen, die in Zusammenhang mit den untersuchten Biomarkern stehen können, identifiziert. So wurden Sedimentproben der Stationen auf eine Reihe von PAHs, PCBs und einige

Schwermetalle untersucht, und in den Muskeln der Fische wurden zusätzlich einige Pestizide, (aber keine PAHs) analysiert.

Die höchsten Konzentrationen von PAHs, PCBs und Schwermetallen traten verteilt, und offenbar unabhängig voneinander, an den unterschiedlichen Orten auf, und die PCB-Konzentrationen in den Muskeln waren anders verteilt als im Sediment (s. Ergebnisse 3.6.6 und Anhang 4).

Statistische Korrelationen der Wirkung einzelner analysierter Inhaltsstoffe mit den verschiedenen Biomarkern konnten kaum nachgewiesen werden. Mögliche Anhaltspunkte für Zusammenhänge ergaben sich am ehesten bei den PCBs: Für die PCBs in den Fischmuskeln könnte ein Zusammenhang zwischen deren Konzentration und der Gentoxizität im Comet Assay angenommen werden. Bei der Interpretation sind allerdings mehrere Dinge zu beachten: Die PCBs stellen eine ganze Gruppe von Substanzen dar, wobei die einzelnen Kongenere unterschiedliche Gentoxizität/Karzinogenität aufweisen. Immerhin waren in der vorliegenden Arbeit alle PCB-Parameter im Muskel (HCB, PCB 153 und Summe der PCBs) mit der Gentoxizität korreliert (s. Anhang 4 u. 3.6.6). Bei PCBs muss außerdem laut Literatur nicht generell eine DNA-Strangbrüche verursachende Wirkung vorliegen, die sich mit dem Comet Assay nachweisen lässt. So konnten Belpaeme et al. (1996) im Comet Assay bei Forellen (*Salmo trutta*) keine Wirkung des PCB 77 feststellen, während Sargent et al. (1989) bei demselben PCB chromosomale Aberrationen in Humanlymphozyten fanden. Andere PCB-Kongenere besitzen wiederum andere gentoxische Potenziale. Um hier genauere Erkenntnisse zu gewinnen, müssten die Einzel-PCBs, die in den einzelnen Fischen vorhanden waren, bekannt sein (bzw. zukünftig untersucht werden) und außerdem weitere Daten zu deren Gentoxizität gewonnen werden. Die hier gefundenen Ergebnisse sollten außerdem im Versuch mit den PCBs an Döbeln bestätigt oder falsifiziert werden.

Für die fehlenden Effekte bei den übrigen analysierten Stoffen (vor allem PAHs und Schwermetalle) bleiben prinzipiell viele Erklärungsmöglichkeiten. Zunächst müsste bekannt sein, welche stoffspezifischen Schwellenwerte für die Wirkung beim Döbel gelten - was sicher bisher nicht in Ausführlichkeit bekannt ist. Ein Ansatzpunkt wäre hier zumindest die Arbeit von Smith et al. (1996). Danach wären hier nur für Arsen (Archettes) und die PCBs (Igney) im Sediment Schwellenwerte erreicht. Selbst wenn man Blei mit in Betracht zieht, so ist beispielsweise dessen Gentoxizität nicht so stark und nicht bei solch einem breiten Spektrum von Organismen anzunehmen, wie das bei einigen anderen Schwermetallen (wie z. B. Cd) der Fall ist (Johnson 1998). Auch eine experimentelle Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Pb wurde nicht immer gefunden. Gegenüber der Erwartung ausbleibende gentoxische Effekte können auch mit geringer Bioverfügbarkeit oder einfach fehlender Exposition zusammenhängen. Dies gilt besonders für das Sediment, dem die Fische nicht unbedingt und ständig ausgesetzt sein müssen, bzw. müssen selbst bei Kontakt oder Aufnahme von Sediment nicht alle Stoffe aufgenommen werden. So unterschieden sich z. B. die PCB-Konzentrationen im Fischmuskel und im Sediment von Igney besonders stark voneinander. In der vorliegenden Untersuchung können also kaum Rückschlüsse vom Vorkommen gentoxischer Stoffe im Sediment auf die Gentoxizität bei in der Nähe gefangenen Fischen gezogen werden. Die Diskrepanz zwischen PCB-Konzentrationen im Muskel und im Sediment (s. Anhang 4) könnte durch die Mobilität und Migration der Fische, die

tatsächliche Aufnahme, Bioverfügbarkeit, Biotransformation und Verteilung zustande kommen. Um Erwartungen über eine Gentoxizität genauer überprüfen zu können, wäre außerdem die genaue Kenntnis der chemischen Zusammensetzung z. B. von PAHs und PCBs notwendig. Starke Variationen der Wirkung sind auch innerhalb der Stoffklasse möglich.

Was die vorhandenen gentoxischen Effekte betrifft, muss beachtet werden, dass diese durch andere Kontaminationen als die hier analysierten Stoffe hervorgerufen worden sein können. Außerdem sind bei den hier vorliegenden komplexen Umweltgemischen Kombinationswirkungen in Betracht zu ziehen, wobei selbst für die mögliche Kombinationswirkung der hier analysierten PCBs und PAHs mit dem bisherigen Wissensstand kaum Vorhersagen (bzw. Erwartungen) aufgestellt werden können.

Über weitere Ursachen für die gefundenen Effekte kann spekuliert werden. Beispielsweise können im Fall der Gentoxizität unspezifische oxidative DNA-Schäden in Betracht gezogen werden, die möglicherweise durch Aktivität der Fische oder hohen Sauerstoffgehalt im Wasser ausgelöst worden sein können (analog zu den o.g. Ergebnissen von Liepelt et al. 1995). Für die PAHs und die Gentoxizität kann wiederholt werden, was bereits oben in Bezug auf Zusammenhänge zwischen CYP450-Induktion und Gentoxizität gesagt wurde: Die Metabolisierung führt nicht zu einer sofortigen und linearen Zunahme von DNA-Schäden und gleichzeitig wirken Detoxifikationsmechanismen wie Phase-II-Metabolisierung und DNA-Reparatur der Schädigung entgegen.

Die Ursachen für die Kontaminationen sind wahrscheinlich ebenfalls komplex. Die allgemeinen Informationen über die untersuchte Region an der Mosel wie auch die Untersuchungsergebnisse deuten auf mehrere unterschiedliche Schadstoffquellen hin. In Bezug auf die Gentoxizität kann - neben vielen anderen Erklärungen - beispielhaft über ein Modell spekuliert werden, bei dem man stromauf eine Kontaminationsquelle annimmt, deren Wirkung dann durch Verdünnung und Selbstreinigung des Gewässers stromabwärts abnimmt.

Dies wäre eine durchaus mögliche Situation, auch wenn der einfachste und typischste Fall oft anders aussieht: Sowohl in der vorliegenden Arbeit wurde mit den *in vitro*-Versuchen zum Wasser aus dem Rhein stromabwärts eher eine Zunahme von gentoxischer und chemischer Belastung festgestellt. Ebenso war solch eine korrelierte Steigerung stromabwärts bei Biomonitoring-Untersuchungen des Nils festzustellen: Diese *in situ*-Untersuchungen fanden - wie die hier gezeigten von Döbeln aus der Mosel - ebenfalls an Erythrozyten von Fischen statt, wobei physikochemische Parameter des Wassers und die Gentoxizität im Mikronukleus-Test (Osman et al. 2011) und im Comet Assay (Osman et al. 2012) gemessen wurden. In diesen Fällen liegt wohl der typische Fall vor, dass sich die Schadstoffeinträge und deren Effekte flussabwärts immer weiter aufsummieren. Die Situation in der Mosel wich von solch einem Schema ab, ohne dass hier die Ursache dafür endgültig geklärt werden kann.

Schlussfolgerungen:

Es konnte gezeigt werden, dass der Comet Assay sehr gut auf Fischerythrozyten übertrag- und anwendbar ist und eine praktische Methode zum Biomonitoring

gentoxischer Schädigung darstellt. Die vorliegende Untersuchung weist auf gentoxische Potenziale im Gewässer hin, die durch entsprechende Kontaminationen des Wassers und/oder Sediments im für die Fische zugänglichen Bereich der Probenahmestellen verursacht sein müssten. Um aber zu wirklich stichhaltigen Ergebnissen zu gelangen, sind vor allem gültige Negativkontrollen nötig. Wie sich auch in einer hier nicht dargestellten Folgeuntersuchung zeigte (Flammarion et al. 2002), sind solche Negativkontrollen nicht einfach zu gewinnen, da kontaminationsfreie natürliche Lebensräume eine Seltenheit darstellen. Eventuell wäre die Hälterung von Fischen im Labor ein möglicher Ausweg. Um zu weiteren Aussagen über Ursache und Wirkung von Kontaminationen und zur Beziehung der Biomarker zueinander (vor allem EROD-Aktivität, indirekte Gentoxine und DNA-Strangbrüchen) zu gelangen, sind sowohl kontrollierte Laborexperimente notwendig, als auch die Erfassung möglichst umfangreicher Datenmengen aus weiteren Biomonitoring-Untersuchungen. Wenn es um Ursachenforschung geht, sollte die chemische Analytik in Zukunft, wenn technisch möglich, ausgebaut werden. Dies gilt in Bezug auf das Substanzspektrum, die Details (Daten aus Einzelfischen zur Korrelation mit den Biomarkern) und weitere Analyseobjekte (z. B. Metabolite von PAHs in der Gallenflüssigkeit). Erwartungen über die Ergebnisse bestimmter Kontaminationssituationen könnten wegen der Vielfalt der Parameter wohl nur mit Hilfe komplexer Modelle aufgestellt werden.

4.5 Beurteilung des Comet Assay an Fischzellen

4.5.1 Literaturvergleich von Prinzip und Methodik des Comet Assay mit anderen Gentoxizitätstests

Um eine Beurteilung des Comet Assay hinsichtlich seiner Methodik vornehmen zu können, muss er anhand von Literaturdaten mit anderen Gentoxizitätstests verglichen werden, da in der vorliegenden Arbeit bis auf wenige Ausnahmen keine anderen Gentoxizitätstests praktisch durchgeführt wurden. Um hier nicht zu sehr von der wesentlichen Argumentationslinie abzuweichen, doch andererseits die notwendigen Informationen zu liefern, werden die Gentoxizitätstests - einschließlich des Comet Assay - im **Anhang 5** beschrieben und mit dem Comet Assay verglichen. Dabei geht es im Wesentlichen um folgende Tests:

- 1) Comet Assay
- 2) Alkalische Filterelution, alkalische Entwindung und DNA-Elektrophoresen
- 3) Nick Translation Assay, Einzelstrang-DNA-ELISA
- 4) Adduktnachweise mittels ³²P-Postlabeling-Methode und HPLC
- 5) UDS-Test
- 6) Mikronukleus-Assay, Chromosomenaberrationstest, SCE-Test
- 7) SOS-Chromotest, Ames-Test und umu-Test
- 8) Mutationstests an Eukaryonten *in vivo*

4.5.2 Beurteilung anhand methodischer Argumente

In Bezug auf seine Sensitivität im Sinne von niedrigen Nachweisgrenzen ist der Comet Assay den meisten anderen Tests überlegen. Dies und seine anderen praktischen Vorteile

(z. B. schnellere Durchführbarkeit) scheinen ihn gegenüber anderen Methoden zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen mit gleichem Wirkprinzip überlegen zu machen. Dass einige Substanzen bei bestimmten Zelltypen nicht sensitiv angezeigt werden, ist sehr wahrscheinlich bei anderen Tests bei konstantem Endpunkt auch der Fall (zum Sensitivitätsbegriff s. 3.4.2.1). Lediglich Argumente des höheren Probendurchsatzes und der Einsparung der mikroskopischen Auswertung können andere DNA-Trennungsmethoden noch für sich geltend machen. Das breite Anwendungspotenzial des Comet Assay macht ihn jedoch flexibler. Wegen der grundsätzlichen Automatisierbarkeit und Miniaturisierbarkeit, die bereits von einigen Entwicklern verwirklicht wurde (Bocker et al. 1999; McNamee et al. 2000; Kiskinis et al. 2002 siehe auch Anhang 5), können auch diese Nachteile ausgeglichen werden.

Die - mit Ausnahme der Auswertung - praktischen Vorteile des Comet Assay geben dem Test neben seiner Sensitivität ebenfalls meist eine hervorragende Position. Hier muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Praktikabilität des Tests auch von der Art seiner Anwendung abhängig ist. Als Nachteil kann dies keinesfalls gesehen werden, denn der Assay ist stark variierbar - seine geradezu universelle Anwendbarkeit bei Wirbeltierzellen sowohl für Substanzproben *in vitro* als auch für die in Biomonitoring und Diagnostik angewandten Zellentnahmen geben ihm eine bisher einmalige Position unter den Gentoxizitätstests. Besonders der Begriff "Einzelzell-Gelelektrophorese" für den "Comet Assay" ruft ins Bewusstsein, dass eine Vielzahl möglicher Anwendungen besteht. Beim Vergleichen von Ergebnissen muss lediglich stärker als bei anderen, standardisierten Tests darauf geachtet werden, welche Methodik jeweils angewandt wurde.

Im speziellen Fall der *in vitro*-Testung von komplexen Umwelt-Wasserproben ist als Vorteil der meisten eukaryontischen Tests einschließlich des Comet Assay noch hervorzuheben, dass native, unfiltrierte Proben getestet werden können, was bei den bakteriellen Tests wie Ames- und umu-Test nicht möglich ist. Dort ist die Filtration notwendig, um andere, störende Mikroorganismen herauszufiltern, jedoch werden so auch Partikel herausgefiltert, die eigentlich mitgetestet werden sollten (Erdinger et al. 2000).

Die Optimierung des Comet Assay muss in Abhängigkeit vom jeweiligen Einsatzgebiet vorgenommen werden, sodass hier nur Beispiele gegeben werden können. Ein Nachteil, der eher allgemeiner Natur zu sein scheint, ist seine Inter-Elektrophoresen-Varianz (siehe diese Arbeit, Kapitel 4.1.5 und De Boeck et al. 2000). Um dies quantitativ zu verbessern, sollte wohl noch weiter nach technischen Verbesserungen gesucht werden, aber letztendlich muss sich das Problem nicht unbedingt in einer schlechteren "Bedeutsamkeit" der Ergebnisse niederschlagen. Die Einzelergebnisse müssen nur jeweils validiert werden. Dies kann dadurch geschehen, dass Grenzen für die Variabilität gesetzt werden, wie z. B. in der vorliegenden Arbeit durch Einbeziehung historischer Werte oder z. B. bezogen auf die zweifache Standardabweichung der Negativkontrolle (De Boeck et al. 2000). De Boeck et al. schlagen auch zwei Formeln vor, die die Messwerte in Bezug auf die Negativ- bzw. Positivkontrollen relativieren, sodass auch so eine gewisse Korrigierbarkeit/Normalisierbarkeit gegeben ist. Neben der Elektrophorese könnte es sich auch lohnen, andere Komponenten der Testsysteme genauer zu untersuchen, die gar nicht notwendigerweise spezifisch für den Comet Assay sind. Hier wäre z. B. die

Konstanthaltung der Zelldichte in *in vitro*-Versuchen zu nennen, bzw. Untersuchungen darüber, wie genau eigentlich die Zellzählungsverfahren sind und wie sich dies auf die Comet Assay-Ergebnisse niederschlägt.

Eine weitere wünschenswerte Optimierung wäre eine Vergrößerung des Probendurchsatzes, damit umfangreiche Vergleiche in kurzer Zeit durchgeführt werden können. Besonders zeitintensiv und ermüdend ist vor allem die manuelle Auswertung am Mikroskop. Einerseits müssten hier statistische Verfahren angewandt werden, die es ermöglichen, zu entscheiden, welche Anzahlen von Zellen im Einzelfall ausgewertet werden müssen; Einige Anwender werten z. B. zwei Objektträger mal 25 Zellen aus - der Test verliert dabei durch Verringerung der Zellzahl bei konstant gehaltener statistischer Sicherheit an Sensitivität. Andererseits müsste automatisiert (z. B. fahrbarer, computergesteuerter Objektisch) und miniaturisiert werden. Dass Miniaturisierung und Automatisierung aktuell vorangetrieben werden, wurde bereits oben erwähnt. Ein anderer Beitrag, um umfangreiche Vergleiche anstellen zu können, wäre die Standardisierung des Systems, sodass eine Verteilung auf mehrere Labors ermöglicht würde. Hierfür müssten wohl jeweils interne Konzepte gefunden werden. In den Guidelines von Tice et al. (2000) wird jedoch immerhin versucht, minimale Bedingungen zu etablieren, unter denen der Assay allgemein akzeptiert werden kann. Neben diesen Beispielen sind weitere, praktisch unzählige - problemspezifische Optimierungsmöglichkeiten des Comet Assay gegeben.

4.5.3 Biologische Relevanz, Validierung gegenüber anderen Gentoxizitätstests und Begriffe zur Quantifizierung

Die biologische Relevanz eines Gentoxizitätstests müsste streng genommen empirisch festgestellt werden, indem die Testergebnisse mit der jeweiligen interessierenden spezifischen Schädigung an den interessierenden Organismen korreliert werden. So würden wohl die sichersten Aussagen erreicht werden. Die zu untersuchenden biologisch relevanten Schädigungen wären beispielsweise Karzinogenität oder Letalität bei den betreffenden Organismen. Die höchste biologische Ebene, auf die sich die Gentoxizität auswirken kann, stellen Populationen und Ökosysteme dar. Experimente zu den genannten biologisch relevanten Effekten sind meist entsprechend ihrer hohen Komplexität nicht einfach durchzuführen, benötigen längere Zeit und größere Anzahlen von Versuchstieren bzw. verbieten sich am Menschen meist ganz. Wohl aus diesen Gründen findet man in der Literatur häufiger abgeleitete, schlussfolgernde Vorgehensweisen als direkte Vergleichsexperimente. Üblich ist z. B. neben den eigenen Ergebnissen Gentoxizitätstests Primärliteratur anderer Autoren zur Karzinogenität bestimmter Substanzen heranzuziehen und dann mit denselben Substanzen zu arbeiten, ohne allerdings wiederum die Karzinogenität im eigenen Testsystem nachzuprüfen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden keine Experimente zu relevanten Folgeeffekten durchgeführt, aber es können Schlussfolgerungen zur biologischen Relevanz des Testsystems gezogen werden, z. B. durch die oben beschriebene Vorgehensweise, dass einige bereits als Karzinogene bekannte Stoffe eine positive Testantwort im Comet Assay hervorriefen.

Für die Beschreibung der Korrelation des Comet Assay einerseits mit Testsystemen des biologisch interessierenden Parameters andererseits bieten sich verschiedene statistische

Methoden wie Korrelationstests an, bzw. muss einfach die Übereinstimmung bzw. Verschiedenheit zwischen Testergebnis und dem relevanten Parameter beschrieben und quantifiziert werden. In der Epidemiologie dafür übliche Parameter sind in Tabelle 33 definiert. Sie erleichtern die Validierung eines Tests gegenüber einem zweiten Testsystem oder dem "wahren" Auftreten des interessierenden Merkmals, z. B. einer bestimmten Krankheit (welche ja ebenfalls mit "Tests" im weiteren Sinne diagnostiziert wurde). Während die **Sensitivität** zeigt, welchen Anteil von positiven Testergebnissen des Bezugssystems der "Test Nr. 1" richtig erkennt (Ziel: wenig Falsch-Negative), und die **Spezifität** die Übereinstimmung mit den negativen Ergebnissen beschreibt (Ziel: wenig Falsch-Positive), ist die **Konkordanz** am umfassendsten, indem sie generell die positiven und negativen "Treffer" des "Tests Nr. 1" im Bezugssystem beschreibt. Je weiter ihr Wert gegen 1 geht, desto besser die Übereinstimmung, d. h. desto weniger falsch Positive (= b) und falsch Negative (= c) liefert ein Test Nr. 1 gegenüber einem Test Nr. 2.

Tabelle 33: Kontingenztafel (Vierfeldertafel)/Schnittmengenbestimmung und statistische Begriffsdefinitionen, die in der Epidemiologie zum Vergleich der Übereinstimmung bzw. zur Validierung von zwei Testsystemen an ein und derselben Probengesamtheit benutzt werden. Plus (+) und Minus (-) stehen für positive bzw. negative Testergebnisse, die Buchstaben a, b, c, d stehen für die Anzahlen von Proben, die sich durch die jeweiligen Schnittmengen aus den beiden Tests ergeben. Die Begriffe können z. B. auch zur Validierung eines Gentoxizitätstests gegenüber der Diagnose "Probe erzeugt Krebs" benutzt werden. Anmerkung: Die "Sensitivität" wird hier nicht im Sinne einer niedrigen Nachweisgrenze verwendet - wie sonst in der vorliegenden Arbeit. Über die Definitionen scheint in der Literatur nicht immer Einigkeit zu bestehen - die hier gezeigten Definitionen sind jedoch der Standard (z. B. Richtlinien der ICCVAM & NICEATM, 1999).

Testsystem Nr. 1	Testsystem Nr. 2 bzw. Krankheitszustand (Bezugssystem)	
	+	-
+	a (korrekt positiv)	b (falsch positiv)
-	c (falsch negativ)	d (korrekt negativ)
Sensitivität = $a / (a + c)$ Spezifität (Selektivität) = $d / (b + d)$ positiver Vorhersagewert = $a / (a + b)$ negativer Vorhersagewert = $d / (c + d)$ Konkordanz (concordance, accuracy) = $(a + d) / (a+b+c+d)$ Inzidenz = $(a + c) / (a+b+c+d)$		

Wie oben beschrieben, ist es eher selten, dass Gentoxizitätstests in einer direkten Weise gegenüber karzinogenen Wirkungen evaluiert wurden. Auch für den relativ neuen Comet Assay gibt es bisher keine derartigen Arbeiten. Aber selbst für andere Gentoxizitätstests ist es meist nicht üblich oder möglich, in einem einzigen Labor parallel Karzinogenitätstests durchzuführen, die eine hundertprozentige Vergleichbarkeit zulassen. Häufiger sind Arbeiten, in denen die Übereinstimmung nur anhand des Kriteriums überprüft wird, ob eine Substanz bekanntermaßen karzinogen ist, nach Möglichkeit an derselben Spezies wie im Gentoxizitätstest. In genaueren Arbeiten wird ausführlicher mit den Karzinogenitätsdaten verglichen, die aber, wie gesagt, meist aus der Literatur entnommen werden. Auch für den Comet Assay sind einige wenige

Arbeiten dieses Validierungs-Typus vorhanden. Zu einem ganz geringen Teil finden sich auch Daten zur Korrelation mit der (Zyto-) Toxizität als Folge der Gentoxizität. Ebenso gibt es Vergleiche mit anderen der oben genannten Gentoxizitätstests (s. 4.5.1 bzw. Anhang 5). Da für diese wiederum direkte und indirekte Validierungen gegenüber der Karzinogenität vorliegen, kann man sich so ein ungefähres Bild über die Aussagefähigkeit des Comet Assay zur Karzinogenität machen.

Die Tabelle 34 fasst einige der Daten zusammen:

Tabelle 34: Vergleichende Daten zur Validierung des Comet Assay gegenüber anderen Gentoxizitätstests (siehe auch Anhang 5) bzw. biologisch relevanten Wirkungen wie Karzinogenität. Die Angaben zu Sensitivität, Konkordanz etc. stammen meist nicht von den Autoren der Arbeiten, sondern wurden hier extra berechnet.

Vergleichssysteme	Ergebnisse	Quelle
<p>Comet Assay versus 208 karzinogene Agentien (aus den Datenbanken der IARC u. des National Toxicology Program, USA); <i>in vivo</i></p> <p>Comet Assay <i>in vivo</i> versus eigener und Literaturdaten anderer Gentoxizitätstests, z. B.: -Ames-Test (<i>in vitro</i>), -MNA</p> <p>Untersuchung der Organspezifität bei Maus und Ratte</p> <p><u>Bisher umfassendste Studie zum Thema</u></p>	<p>141 Comet-Positive (Maus/Ratte) in 208 Karzinogenen. Von diesen 208 waren wiederum 185 karzinogen in Maus/Ratte. Aus den Angaben in der Publikation (dort. Tabelle 12) können die Parameter ungefähr wie folgt bestimmt werden: Für <u>Comet versus Karzinogenität</u>: Sensitivität: ca. 71 %; Spezifität: ca. 61 %; pos. Vorhersagewert: ca. 94 %; negativer Vorhersagewert: ca. 21 %; Konkordanz: ca. 70 %; Inzidenz: ca. 89 %.</p> <p>112 Comet-Positive in 128 Ames-Positiven, wobei 117 davon auch Karzinogene sind. Für <u>Comet versus Ames-Test</u>: Sensitivität: ca. 88 %; Spezifität: ca. 69 %; pos. Vorhersagewert: ca. 86 %; negativer Vorhersagewert: ca. 72 %; Konkordanz: ca. 82 %; Inzidenz: ca. 68 %.</p> <p>Sowohl Ames-Test als auch Comet Assay zeigten 20-30 % falsch Negative bezogen auf karzinogene Wirkung. In der falsch negativen Aussage stimmte der Comet Assay zu mehr als 50 % mit dem Ames-Test überein: ---> Hinweis auf möglichen nicht-gentoxischen Mechanismus der betreffenden Substanzen.</p> <p>137 MNA-getestete Substanzen konnten herangezogen werden. <u>Comet versus MNA im Knochenmark der Maus</u>: Sensitivität: ca. 41 %; Spezifität: nicht genau entnehmbar, wahrscheinlich > 80 %; pos. Vorhersagewert: nicht genau entnehmbar, wahrscheinlich > 70 %; negativer Vorhersagewert: nicht genau entnehmbar, wahrscheinlich < 60 %; Konkordanz: nicht genau entnehmbar, wahrscheinlich > 60 %; Inzidenz: nicht genau entnehmbar, wahrscheinlich < 60 %.</p> <p>Sensitivitäten anderer Tests bezogen auf Karzinogenität sind der Publikation nicht immer eindeutig entnehmbar, liegen vorbehaltlich der richtigen Interpretation der Publikation bei ca. 79 % (Ames-Test), ca. 54 % (Chromosomenaberrationen), ca. 38-49 % (MNA).</p>	Sasaki et al. 2000
Literaturvergleich: Comet Assay versus 95 karzinogene Agentien, <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Daten gemischt	Sensitivität = 88 %, = 84 Karzinogene, von denen 74 Comet-positiv getestet wurden; Spezifität = 64 % = 11 Nicht-Karzinogene, von denen 7 Comet-negativ getestet wurden, pos. Vorhersagewert: 95 % (74/78); neg. Vorh.: 41 % (7/17); Konkordanz = 85 % (81/95)	Anderson et al. 1998
Comet Assay und MNA versus 66 Testsubstanzen; Comet Assay versus MNA; <i>in vitro</i>	Insgesamt hoher Grad an Konkordanz zwischen Comet Assay und MNA. Sensitivität: 58 %; Spezifität: 100 %; pos. Vorhersagewert: 100 %; negativer Vorhersagewert: 64 %; Konkordanz: 75 %; Inzidenz: ca. 68 %.	Hartmann et al. 2001
Comet Assay versus Ames-Test; <i>in vitro</i>	Nur 4 von 39 Ames-positiven Substanzen waren positiv im Comet Assay. 16 Ames-negative Substanzen waren positiv im Comet Assay (20 % Sensitivität bezogen auf den Ames-Test)	Hartmann et al. 2001
Comet Assay versus Zytotoxizität nach 8 d; gentoxische Agentien (Monosubstanzen) <i>in vitro</i>	Zellen, die geringere DNA-Schäden hatten, hatten in der Folge auch eine geringere Zytotoxizität als solche mit stärkeren DNA-Schäden	Olive et al. 1997

Tabelle 34 (Fortsetzung)

Vergleichssysteme	Ergebnisse	Quelle
Comet Assay versus MNA; 4 karzinogene Substanzen <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i>	Alle 4 Substanzen zeigten positive Testergebnisse im Comet Assay und im MNA	Robbiano et al. 1999
Comet Assay versus SCE-Test; gentoxische Agentien (Monosubstanzen) <i>in vitro</i>	BaP und MNNG zeigten in beiden Tests eine positive Reaktion, Cyclophosphamid war im Comet Assay erst bei höheren Konz. positiv	Hartmann & Speit 1995
Comet Assay versus SCE-Test; Biomonitoring <i>ex vivo</i>	Die Lymphozyten von Rauchern zeigten DNA-Schädigung im Comet Assay, nicht im SCE-Test	Betti et al. 1994
Comet Assay versus, Alkalische Elution; 3 gentoxische Agentien <i>in vitro</i>	Die beiden Tests reagierten bei allen 3 Subst. übereinstimmend positiv, jedoch war die Alkalische Elution deutlich insensitiver in Bezug auf die Nachweisgrenze	Leroy et al. 1996
Comet Assay versus Nick Translation Assay; 3 gentoxische Agentien <i>in vitro</i>	Der Comet Assay reagierte positiv, während der Nick Translation Assay negativ war bzw. erst bei sehr hohen, zytotoxischen Konzentrationen reagierte	Leroy et al. 1996
Comet Assay versus MNA; 6 gentoxische Agentien <i>in vivo</i>	Bei 2 direkt gentoxischen Substanzen und bei BaP zeigten sich übereinstimmend positive Testergebnisse mit z.T. sensitiverem MNA, 3 indirekt gentoxische Substanzen reagierten Comet-negativ und MNA-positiv	Vrzoc & Petras 1997
Comet Assay versus MNA; karzinogenes Cobalt und 2 Legierungen <i>in vitro</i>	Beide Testsysteme reagierten auf die Substanzen positiv, der Comet Assay zeigte die höhere Sensitivität in Bezug auf die Nachweisgrenzen	Van Goethem et al. 1997
Comet Assay versus MNA; 10 Agentien	Ein Literaturdatenvergleich mit 20 Testsystemkombinationen (z. B. mit/ohne S9) zeigt überwiegend gleiche Testergebnisse und höhere Sensitivität in Bezug auf die Nachweisgrenzen beim Comet Assay	Van Goethem et al. 1997
Comet Assay versus SCE-Test sowie CA; Biomonitoring <i>ex vivo</i>	Durch den Einfluss einer Mülldeponie waren im Durchschnitt sowohl CAs als auch Ergebnisse des Comet Assay signifikant erhöht. Dies galt nicht für den SCE-Test. Zwischen Comet Assay und den zytogenetischen Tests wurde keine statistisch signifikante Korrelation gefunden.	Hartmann et al. 1998
Comet Assay versus MNA sowie CA; Biomonitoring <i>ex vivo</i>	Exponierte Arbeiter einer Gummifabrik zeigten im Comet Assay und MNA erhöhte Werte, die individuellen Werte von Comet Assay, MNA und CA zeigten signifikante Korrelationen	Somorovska et al. 1999
Comet Assay versus AFE, DNA-Aufwindungstest, UDS-Test, Ames-Test, umu-Test; 5 gentoxische Agentien <i>in vitro/in vivo</i>	Der Comet Assay, der umu- und ein modifizierter Ames-Test zählten für NQO zu den sensitivsten Tests in Bezug auf die Nachweisgrenzen, bei indirekten Gentoxinen war das Comet-Ergebnis stark vom verwendeten Zelltyp abhängig, AAF war meist Comet-negativ, BaP und DMNA konnten dagegen z.T. empfindlich nachgewiesen werden	vorliegende Arbeit und Grummt 2000

Aus Tabelle 34 wird ersichtlich, dass nur die Arbeiten, die in der Tabelle an oberster Stelle stehen, von der Konzeption und der Anzahl der Versuche her eine systematische Validierung gegenüber karzinogenen Substanzen vornahmen. Die meisten anderen Arbeiten sind nicht umfangreich genug, um verallgemeinerbare quantitative Ergebnisse zuzulassen.

In Auswertung der Tabelle 34 kann gesagt werden, dass der Comet Assay generell offenbar in der Lage ist, karzinogene Substanzen mit hoher Sensitivität - im Sinne einer Definition wie in Tabelle 33 - zu detektieren. Des Weiteren lag die Konkordanz z. B. in den drei erstgenannten Arbeiten bei 70 %, 85 % bzw. 75 %. Bevor nun die Aussagefähigkeit des Comet Assay für eine Vorhersage karzinogener Wirkungen

behandelt wird, sollen jedoch noch die Vergleiche mit den anderen Gentoxizitätstests einbezogen werden.

Wie bereits angedeutet, liegen für die anderen Gentoxizitätstests ebenfalls Validierungsversuche gegenüber der Karzinogenität als Referenz vor. Vor allem ist dies für den Ames-Test der Fall (siehe Anhang 5.7), der ein historischer Vorreiter und Prototyp der Gentoxizitätstests ist, eine weite Verbreitung besitzt und in regulativen Vorschriften festgeschrieben und standardisiert ist. In Validierungsstudien erreichte der Ames-Test eine hohe Korrelation mit der Karzinogenität. So wird von 90 % positiven Tests bei Substanzen, die karzinogen sind, berichtet (McCann et al. 1975) und von 66 % Konkordanz des Ames-Tests gegenüber der Karzinogenität (Zeiger et al. 1990, Legault et al. 1994). Besonders der Vorhersagewert des Ames-Tests - im Sinne einer Definition wie in Tabelle 33 (die genaue Definition sollte jeweils der Originalliteratur entnommen werden)- lag mit Werten um 77-90 % gegenüber einigen anderen Gentoxizitätstests sehr hoch (Zeiger et al. 1990, Übersichtsartikel: Mortelmans & Zeiger 2000). Die Sensitivität (i.S. einer Definition wie in Tab. 33) des Ames-Tests liegt relativ hoch, er besitzt aber den Nachteil, dass er zu falsch positiven Ergebnissen neigt (Zeiger et al. 1990, Madle & Lang 1993), mit anderen Worten: seine Spezifität niedriger ist als bei einigen anderen Tests, wie z. B. dem Maus-Lymphoma-Test oder dem SCE-Test (Zeiger et al. 1990).

Offenbar besitzen viele Gentoxizitätstests eine statistische Karzinogenitäts-Konkordanz um die 60 %, also kann wohl kein Gentoxizitätstest alle Karzinogene und Nicht-Karzinogene vollkommen richtig erfassen. Dies wäre selbst dann noch der Fall, wenn man ideale Testbedingungen annähme und die Details wie Konzentrationen und Applikationsweisen (dazu s.u.) genau mit dem Karzinogenitätstest übereinstimmen würden. Dies erklärt sich zum einen aus der Vielzahl unterschiedlicher gentoxischer Endpunkte der verschiedenen Karzinogene, zum anderen auch aus der wichtigen Tatsache, dass eine ganze Reihe nichtgentoxischer Karzinogene existiert. Für diese Stoffe gelten Wirkmechanismen, bei denen nicht primär ein Angriff auf die DNA stattfindet, sondern bei denen z. B. eine tumorpromovierende Signalwirkung besteht. Als sichere Methode kann also nur jeweils eine Untersuchung des interessierenden Stoffes an dem interessierenden Organismus gelten - eine triviale Tatsache, die wohl allgemein für Biotests gilt, aber nicht vergessen werden darf. Der Sinn eines Gentoxizitätstests liegt neben der Wirkungsdetektion aber natürlich darin, die Testung zu vereinfachen und sowohl Zeit und materielle Ressourcen als auch - aus ethischen Gründen - Versuchstiere einzusparen. Diese Funktionen kann der Comet Assay offenbar erfüllen. Er reagiert ebenso wie andere anerkannte Gentoxizitätstests auf Karzinogene, wobei eine hohe Sensitivität im Sinne einer Definition wie in Tab. 33 - also eine vorwiegend richtige Erkennung karzinogener Substanzen - zu verzeichnen ist.

Mit dem Mikronukleus-Assay zeigt der Comet Assay je nach Untersuchung eine mittlere bis sehr hohe Übereinstimmung, während die Untersuchungen über die Übereinstimmung mit dem Ames-Test etwas auseinandergehen: gering (20 %) ist die Sensitivität gegenüber dem Ames-Test bei Hartmann et al. (2001), während sie bei Sasaki et al. (2000) sehr hoch liegt (88 % Sens. u. 82 % Konkordanz, s. auch Tab. 34). Die kausale Interpretation einer Übereinstimmung mit dem MNA kann dahin gehen, dass sowohl MNA als auch Comet Assay clastogene Wirkungen detektieren, während eine manchmal geringe Übereinstimmung mit dem Ames-Test mit den Unterschieden

zwischen Strangbruch- und Mutationstest und zwischen Wirbeltier- und Bakterienzellen erklärt werden könnte - trotz aller Anpassungen des Ames-Tests. Voraussetzung für diese Interpretationen ist allerdings, dass die unterschiedlichen Versuche überhaupt ausreichend miteinander vergleichbar sind und nicht schon durch die Randbedingungen differieren. Trotz der Unterschiede sprechen Validierungsversuche gegenüber der Karzinogenität auch ohne Übereinstimmung der Tests untereinander sowohl für den Comet Assay als auch für den Ames-Test.

Der Comet Assay zeigt eine hohe Sensitivität auch im Sinne niedriger Nachweiskonzentrationen (zu *diesem* Sensitivitätsbegriff s. 3.4.2.1). Dies erklärt sich aus kausal-mechanistischer Sicht: sämtliche Einzelstrangbrüche, Reparaturschnittstellen und alkali-labile Stellen werden unmittelbar nach ihrer Entstehung detektiert, die Prozessierung des Endpunktes liegt vor der zellulären DNA-Reparatur. In den Untersuchungen zur Karzinogenität waren die Konzentrationen der getesteten Stoffe wohl mit großer Wahrscheinlichkeit höher als beim Test mit dem Comet Assay, bzw. es lag eine längere Expositionszeit vor, bzw. die Exposition wurde über einen längeren Zeitraum wiederholt. (Dabei kann allerdings über die unmittelbaren extra- und intrazellulären Konzentrationen, die dabei vorlagen, kaum eine Aussage gemacht werden.) Aus diesen Gründen ist zu erwarten, dass der Comet Assay falsch positive Ergebnisse im Sinne einer Definition wie in Tabelle 33 zeigen würde, wenn im Gentoxizitätstest und im Cancerogenitätstest dieselben niedrigen Konzentrationen oder Expositionsdauern verwendet werden. Das heißt, dass die positiv angezeigten Konzentrationen letztendlich nicht zu Krebs oder anderen offensichtlichen Schadeffekten am Organismus führen würden, selbst wenn die Substanz tatsächlich cancerogen bei höheren Konzentrationen ist. Tatsächlich lassen sich in der *in vivo*-Vergleichsstudie von Sasaki et al. (2000) starke Hinweise darauf finden: Die Empfindlichkeit der verschiedenen getesteten Organe für Krebs stimmte nicht mit der Empfindlichkeit für Comet Assay positive Ergebnisse überein. Ähnliches galt für den Vergleich mit Mutationen in den Zellen der Zielorgane. Der Comet Assay sprach aber in jedem Fall in Organen, in denen auch Krebs entstand, an: "Genotoxicity is necessary but not sufficient for organ-specific carcinogenicity". Es ist also anzunehmen, dass viele DNA-Schäden, die im Comet Assay zu einer geringen oder mittelstarken Reaktion führen, wieder unschädlich gemacht werden.

Es ist demnach wahrscheinlich, dass der Comet Assay in Bezug auf Karzinogenität eine gewisse "Überempfindlichkeit" und damit statistisch falsch positive Ergebnisse zeigt. Diese Eigenschaft ist auf seinen Mechanismus und Endpunkt zurückzuführen und sollte sich daher bei anderen Tests mit gleichem Endpunkt und ähnlicher Methodik ähnlich verhalten. Auch andere Indikatortests (s. 1.1.6) mit anderen Endpunkten sind vermutlich "überempfindlich". Dagegen sollten sich Tests, bei denen bereits manifestierte Chromosomenschäden oder Mutationen angezeigt werden, anders verhalten. Ob die oben genannten empirischen Daten (Tab. 34 u. Text) die Hypothese einer gewissen "Überempfindlichkeit" des Comet Assay stützen, ist fraglich. Zwar steht eine relativ hohe Sensitivität einer zumindest etwas niedrigeren Spezifität (im Sinne der Definitionen in Tab. 33) gegenüber. Eine Spezifität von 61 % impliziert immerhin 39 % falsch positiv angezeigte Nicht-Karzinogene (Tabelle 34 / Sasaki et al. 2000). Der hohe positive Vorhersagewert lässt dagegen eher nicht auf viele falsch Positive schließen. Diese Ergebnisse sind jedoch von der Anzahl der untersuchten nicht-karzinogenen Substanzen

abhängig - und solche "Negativ-" Untersuchungen sind im Allgemeinen seltener; so weisen z. B. Anderson et al. (1998) selbst darauf hin, dass ihre Aussage zur Spezifität noch nicht mit ausreichend Daten unterfüttert ist.

Die genannte mögliche "Überempfindlichkeit" des Comet Assay sollte für einen Gentoxizitätstest im Sinne eines Frühwarnsystems aber als Vorteil bewertet werden. Ein Gentoxizitätstest soll ja oft ein prophylaktisches und empfindliches Frühwarnsystem darstellen, und durch eine prophylaktische Herangehensweise wird generell das Schädigungsrisiko verringert. Reproduzierbare positive Ergebnisse in Gentoxizitätstests sind ernst zu nehmen, da ja ein tatsächlicher Primärschaden angezeigt wird und die kausalen Zusammenhänge mit der Karzinogenität und weiteren Schäden insgesamt erwiesen sind. Vom biochemischen Standpunkt aus kann jede molekulare Reaktion mit der DNA zu einer Veränderung führen, und die statistische Wahrscheinlichkeit von Folgeschädigungen wird erhöht (obwohl der Betrag dieser Erhöhung möglicherweise sehr gering oder an weitere Bedingungen geknüpft ist). Für den Comet Assay im Speziellen sollte bedacht werden, dass die DNA-Strangbrüche als clastogene Schädigungen betrachtet werden können, von denen sich einige später tatsächlich als gefährliche Chromosomenbrüche manifestieren können. Dies wird auch durch seine besonders große Übereinstimmung mit dem MNA im kausalen Mechanismus und im Ergebnis deutlich (siehe Tab. 34, z. B. Hartmann et al. 2001, Somorovska et al. 1999). Der Unterschied zwischen Comet Assay und MNA liegt also eher in der Anzahl der angezeigten DNA-Brüche, nicht in der Qualität - darauf lässt auch die höhere Sensitivität des Comet Assay im Sinne niedriger Nachweisgrenzen schließen. Bei Erhöhung der Konzentration oder chronischer Exposition sind unter Umständen schädliche Effekte zu erwarten. Auch durch gentoxische Vorbelastung könnten eventuelle Schwellenwerte für andere gentoxische Substanzen schneller erreicht werden. Und schließlich muss sollte bedacht werden, dass in den Interpretationen der Karzinogenitätstests sogar falsch negative Ergebnisse vorkommen können. Fehlerquellen können dort in Speziesunterschieden und nicht ausreichenden Anzahlen getesteter Versuchstiere liegen (Hoffmann 1996). Bei Verwendung von Bezeichnungen wie "falsch positiver" oder "unspezifischer" Comet Assay sollte also nicht verallgemeinert, sondern stets genau darauf geachtet werden, auf welches andere Ergebnis ("Testsystem Nr. 2") man sich gerade in seiner statistischen Definition gemäß Tabelle 33 bezieht. Dies können - wie im vorliegenden Kapitel - bestimmte Karzinogenitätsuntersuchungen sein, aber in einer anderen Fragestellung könnten es auch die "wahren DNA-Strangbrüche" sein, die durch eine hypothetische ideale Methode gemessen werden. Während in diesem zuletzt genannten Fall ein falsch positives Ergebnis wirklich ein methodisch fehlerhaftes oder rein zufällig positives Ergebnis bedeuten würde, bedeutet ein falsch positives Ergebnis in Bezug auf Karzinogenität nicht etwa, dass keinerlei Schädigung vorhanden ist. Die im Comet Assay angezeigten Schäden sind - wenn reproduzierbar - real vorhanden und stellen wahrscheinlich eine Erhöhung des Risikos dar. Allerdings steht diese Risikoerhöhung wohl in einem nichtlinearen Zusammenhang mit den detektierten Schäden. Es können z. B. gewisse Schwellenwerte existieren. Solche Schwellenwerte sind aber abhängig von den sonstigen Bedingungen, sind bisher nicht bekannt und können natürlich Anlass zu Streitfällen geben. Um "falschen Alarm" durch den Comet Assay gänzlich auszuschließen und Ergebnisse genau einzuschätzen, müsste wohl oder übel der jeweilige Einzelfall untersucht werden. Neben der schützenden prophylaktischen Annahme, dass ein Risiko bei positivem Test besteht, werden

Verdachtsmomente geliefert, womit ein Untersuchungsbedarf der tatsächlichen Belastbarkeiten der betreffenden Organismen angezeigt wird. Zwei entscheidende Parameter für die Belastbarkeit bzw. das spätere Schicksal der Zellen sind wahrscheinlich die Höhe des Primärschadens und die Reparaturkapazität der Zellen. Solange noch nichts Genaueres bekannt ist, sollten bei der Gentoxizitätstestung die Grenzen eher im Interesse höherer Sicherheit gesetzt werden. Vorangehend wurde gesagt, dass eine mögliche Überempfindlichkeit des Comet Assay besteht. Es muss aber auch eingeräumt werden, dass sich auch auf der anderen Seite ein Ergänzungsbedarf des Tests ergibt: gefährliche Gentoxine, die im Comet Assay falsch negativ bewertet werden (und dies können ca. 30 % sein, s. Daten v. Sasaki et al. 2000 Tabelle 34), müssen zusätzlich erfassbar gemacht werden. Zum einen kann dies durch methodische Anpassungen geschehen, z. B. 1) für indirekt gentoxische Stoffe mit Hilfe adäquat metabolisch kompetenter Zellsysteme und 2) für Crosslinker-Substanzen durch die Einbeziehung eines Vergleichs mit Positivkontrollen und zweiseitigen statistischen Test (Hartmann et al. 2001), zum anderen 3) für nicht detektierbare Substanzen wie Aneugene oder nichtgentoxische Karzinogene durch Kombination/Ergänzung mit anderen Tests. Dazu wird im nachfolgenden Kapitel (4.5.4) noch etwas gesagt werden.

Nachdem die biologische Relevanz am prominentesten Beispiel gentoxischer Folgen - der Karzinogenität - herausgestellt wurde, sollen nun auch noch ein paar Arbeiten erwähnt werden, bei denen die Korrelation nicht auf eine solch direkte Art wie oben beschrieben festgestellt wurde oder bei denen andere Folgen der Gentoxizität überprüft wurden:

Im Biomonitoring von Fischen wurde bereits häufig der MNA eingesetzt und dort wurden auch Zusammenhänge mit an den Fischen sichtbaren Läsionen durch Umweltgifte festgestellt (Rao et al. 1997). Comet Assay und MNA besitzen eine funktionelle Übereinstimmung, die darin besteht, dass sie Clastogene detektieren. Möglicherweise sind auch die besonders hohe Spezifität und positiver Vorhersagewert des Comet Assay für den MNA Indizien für diesen Zusammenhang (s. Tab. 34). Das heißt: Ist ein Stoff mit dem MNA negativ getestet worden, so wird er meist auch im Comet Assay negative Ergebnisse zeigen, und: Ist ein Stoff im Comet Assay positiv getestet worden, so wird er meist auch im MNA positive Ergebnisse zeigen. Ein Unterschied zwischen den Tests besteht dagegen wohl darin, dass der Comet Assay wesentlich mehr Brüche als der MNA anzeigt und sich das in der Regel auch damit belegen lässt, dass der Comet Assay sensibler im Sinne niedriger Nachweisgrenzen ist. Nach der Untersuchung von Hartmann et al. 2001 zeigt der Comet Assay dennoch weniger positive Ergebnisse als der MNA. Dies wird dort auf einen Einfluss von Zytotoxizität im MNA zurückgeführt, d. h., zytotoxische Proben waren im MNA häufiger positiv, während sich dies im Comet Assay nicht auswirkte. Folgt man dieser Interpretation, so wird dadurch der Comet Assay qualitativ (zusätzlich) gegenüber dem MNA aufgewertet, denn die zusätzliche Information durch die MNA-positiven Ergebnisse wäre hier irrelevant. Dies gilt aber nicht für die Detektion z. B. aneugener Substanzen, die offenbar in der Untersuchung nicht vorhanden waren.

Will man die biologische Relevanz eines Gentoxizitätstests beurteilen, so muss man außer der Karzinogenität auch andere Folgen von Gentoxizität einbeziehen. Dabei sind die wichtigsten und einfachsten Parameter wohl Zytotoxizität (als Folge von Gentoxizität - nicht umgekehrt) sowie organismische Letalität. Im Gegensatz zu den Untersuchungen

zur Karzinogenität existieren hier kaum systematische und umfangreiche Untersuchungen mit dem Comet Assay. Zytotoxizität wird - wie in der vorliegenden Arbeit - meist nur parallel zu Gentoxizitätstests untersucht, um DNA-Schädigung als Folge von Zytotoxizität auszuschließen. Dies sagt aber nichts über die umgekehrte Kausalfolge aus. Eine der wenigen anderen Untersuchungen ist die von Olive et al. (1997, Tab. 34). Dort wurde eine Korrelation von Gentoxizität und nachfolgender Zytotoxizität festgestellt. Einen ausreichenden Umfang und eine Quantifizierung bietet die Arbeit jedoch nicht.

Die organismische Letalität, nämlich die akute Letalität in einem standardisierten Test mit Regenbogenforellen, wurde in der Arbeit von Gagné und Blaise (1997) mit der Gentoxizität in den Hepatozyten korreliert. Gentoxischer Endpunkt waren DNA-Strangbrüche (SSBs und DSBs, alkal. Präzipitation, 48 h Exposition). Leider wurden die Daten nicht direkt korreliert, sondern unter Einbeziehung der gesamten Toxizitätsdaten des dortigen "Hepatozytenmodells" unter Zuhilfenahme eines künstlichen neuronalen Netzwerkes. Nach dieser Analyse ergab sich dort eine Sensitivität von 100 % und die Letalität konnte zu 85 % vorhergesagt werden. Obwohl auch die Evaluierung von *in vitro*- und *in vivo*-Gentoxizität dort sehr hohe Korrelationen dieser beiden Parameter ergab, kann hier nicht eindeutig gesagt werden, wieweit die Gentoxizität den Organismus der Fische akut gefährdete.

Abschließend lässt sich zur biologischen Relevanz sagen, dass immer wieder Ergebnisse in den Gentoxizitätstests in der Literatur auftreten, bei denen Erwartungen aus simplen Herleitungen nicht auf den ersten Blick erfüllt werden. Neben den bereits diskutierten Ergebnissen kann hier z. B. noch ein weiteres Beispiel aus Tab. 34 herangezogen werden: Der Comet Assay und die zytogenetischen SCE- und CA-Tests korrelierten nicht im Biomonitoring von Hartmann et al. 1998. Dies verwundert nun wiederum, nachdem gerade die Ähnlichkeit des Comet Assay mit dem zytogenetischen MNA festgestellt wurde. In einem anderen Beispiel aus einem Biomonitoring von Fischen sahen die Autoren ihre Erwartungen einer Gentoxizität in stärker verschmutzten Flussregionen bei Anwendung des MNA bestätigt, aber nicht bei Anwendung des Comet Assay (Bombail et al. 2001). Sie kommen daraufhin zu dem Schluss, der Comet Assay sei möglicherweise nicht als Biomarker in Fischen geeignet. Nach den Ausführungen in der vorliegenden Arbeit erscheint solch ein Urteil wohl als etwas voreilig. In der Behandlung des Biomonitoring wurde angedeutet, wie viele zusätzliche Faktoren bei freilebenden Organismen und Umweltexpositionen eine Rolle spielen können. Im vorliegenden Abschnitt wiederum wird gezeigt, dass durchaus bedeutende Korrelationen mit biologisch relevanten Effekten bestehen und dass der Comet Assay im Vergleich mit anderen Gentoxizitäts- und Mutationstests "gut abschneidet". Einzig die Überlappung zwischen den Tests ist nicht hundertprozentig und ebensowenig die Vorhersagbarkeit bestimmter Effekte aus bestimmten Testergebnissen. In ihrer Diskussion differenzieren Bombail et al. (2001) ihre Aussage dann auch: Weil DNA-Reparatur, Zell-Turnover und Populationsveränderungen in verschmutzten Gebieten für negative Comet Assay-Ergebnisse verantwortlich sein könnten, räumen Sie dem Comet Assay erstens als *in vitro*-Test und zweitens bei Caging-Versuchen (Aussetzen zuvor unbelasteter Fische in einem Käfig im verschmutzten Gewässer) bessere Detektionschancen ein als bei reinen Wildfängen.

Sobald komplexe Proben oder Situationen getestet werden sollen, lassen sich auch bei anderen Gentoxizitätstests Mängel oder Erschwernisse feststellen, die z.T. schwerwiegender sind als die beim Comet Assay mutmaßlich festgestellten. Z. B. neigt der Ames-Test bei komplexen Wasserproben aufgrund von enthaltenen Nährstoffen und Aminosäuren zu falsch positiven Ergebnissen (de Maagd & Tonkes; 2000). Und ein direktes Biomonitoring der betroffenen Organismen *in situ* ist ja naturgemäß mit diesem Test gar nicht erst möglich.

4.5.4 Möglichkeit der Kombination mit anderen Gentoxizitätstests (Testbatterien)

Aus dem Gesagten geht hervor, dass es nicht möglich ist, mit einem bestimmten Gentoxizitätstest alle biologisch relevanten Risiken vollständig auszutesten. Validierungsversuche zur Karzinogenität als Parameter für biologische Relevanz sprechen beispielsweise sowohl für den Comet Assay als auch für den Ames-Test, wobei aber immer auch ein bedeutsamer Anteil von falsch positiven und falsch negativen Tests bleibt. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, besitzen die meisten Gentoxizitätstests bezüglich der Erkennung karzinogener Wirkung eine Konkordanz um die 60 %. Auch wenn in dieser Hinsicht Unterschiede existieren mögen, so resultiert schon aus den unterschiedlichen Endpunkten der Tests, dass sie jeweils nicht sämtliche Faktoren, die zu einer Schädigung führen können, abdecken können. Ein Gentoxizitätstest allein kann also nie alle Karzinogene detektieren. Auch De Maagd & Tonkes (2000) betonen diese Unvollständigkeit der Tests, mindestens die nichtgentoxischen Karzinogene entgehen der Detektion immer. Es liegt also nahe, einen Gentoxizitätstest durch einen oder mehrere weitere Tests zu ergänzen, also eine Testbatterie aufzustellen. Der Begriff Testbatterie trifft wohl besonders zu, wenn der Ablauf und die anzuwendenden Tests von vornherein festgelegt sind. Testbatterien sind schon seit längerer Zeit in der Diskussion und es gibt natürlich unterschiedlichste Vorschläge dafür. Z. B. schlugen Latt et al. (1981) den Ames-Test als schnellen Screening-Test und anschließend den SCE-Test, vorzugsweise *in vivo*, als Nachprüfung vor. In der Veröffentlichung zum Gentoxizitätsprojekt, in dem auch die vorliegende Arbeit integriert war, schlägt Grummt (2000) vor, in einer Basisprüfung zwei bis drei Kurzzeittests anzuwenden, z. B. den Ames-, umu- und Comet Assay *in vitro*. An dieses Basis-Screening sollten dann ggf. andere Tests hierarchisch angeschlossen werden. Hartmann et al. (2001) diskutieren einen teilweisen Ersatz des aufwendigeren MNA durch den Comet Assay in ihrer eigenen Batterie von Tests.

Was ist notwendig, um eine sinnvolle Gentoxizitäts-Testbatterie herzustellen? Unter der Voraussetzung, dass Tests verwendet werden sollten, die eine möglichst hohe biologische Relevanz (also z. B. hohe Krebs-Konkordanz), Reproduzierbarkeit und Praktikabilität besitzen, ist vor allem Komplementarität der eingesetzten Tests zueinander gefragt. Mit anderen Worten: die Endpunkte bzw. die empirisch nachgewiesenen Detektionsbereiche der unterschiedlichen Tests sollten sich möglichst nicht oder nur wenig überlappen, sodass ein möglichst breites Detektionsspektrum entsteht. Der von Hartmann et al. (2001) angesprochene Ersatz des MNA durch den Comet Assay erklärt sich z. B. durch relativ gute Übereinstimmung der Ergebnisse und durch die gemeinsame Detektion clastogener Wirkungen. Dennoch muss hier wieder (s.o.) betont werden, dass Unterschiede darin bestehen, dass einerseits Primärschäden (Comet), andererseits manifestierte Sekundärschäden sowie aneugene Wirkungen

detektiert werden. Die Entscheidung wäre leichter zu treffen, wenn ein Test wie die alkalische Entwindung oder AFE (s. 1.1.6 u. 4.5.1 bzw. Anhang 5) durch den Comet Assay zu ersetzen wäre.

Interessanterweise finden sich in der etwas älteren Literatur Angaben darüber, dass die eben beschriebene Komplementarität von Tests im Ergebnis gar nicht gegeben sei: Tennant et al. (1987) bewerteten eine Batterie aus Ames-, SCE-, CA- und Maus-Lymphoma-Test und kamen zu dem Schluss, dass eine substanzielle Verbesserung gegenüber dem Ames-Test allein im Allgemeinen nicht gegeben war, weiterhin keine Komplementarität zwischen den Tests bestand und die Kombinationen für die Vorhersage von Karzinogenität nicht effektiver war, als wenn nur einer der Tests benutzt worden wäre.. Diese Aussage kann zunächst nur so hingenommen werden, aber einige der anderen bereits zitierten Ergebnisse und auch die unbestreitbare Kenntnis der verschiedenen möglichen Mechanismen und Test-Endpunkte scheinen gegen diese Aussage zu sprechen. Um Zweifel auszuräumen, sollte diese Fragestellung noch einmal systematisch anhand der vorhandenen und evtl. auch weiterer Untersuchungen überprüft werden. Entsprechend der Komplexität des Problems sollten hier größere Datenmengen mit einer möglichst einheitlichen Methodik verglichen werden.

In Zusammenfassung des Gesagten ist eine Testbatterie oder zumindest eine intelligente Ergänzung und Erweiterung eines Gentoxizitätstests wie des Comet Assay durch weitere Tests als sinnvoll, erfolgversprechend und für einige Zwecke notwendig anzusehen, obwohl noch Wissenslücken darüber zu schließen sind, wie viel zusätzliche relevante Information dadurch gewonnen wird. Der Comet Assay, der genetische Primärschäden detektiert, universell anwendbar und in vielen Fällen sehr sensitiv ist, sollte an der Basis einer Testhierarchie stehen, wenn es z. B. um ein Screening von Proben geht, mit dem Karzinogenitätstests eingespart werden sollen. Die *in vitro*-Anwendung ist zu diesem Zweck wahrscheinlich am erfolgversprechendsten. In anderen Fragestellungen können andere Kombinationen und Ansätze sinnvoll sein (s.u.). Der Comet Assay sollte mit möglichst komplementären Tests ergänzt werden, die z. B. Sekundärschäden wie Mutationen, Chromosomenbrüche und -fehlverteilungen oder Mikronuklei anzeigen.

Offen ist noch die weitere Erforschung längerer Expositionszeiten und metabolisch kompetenter Zellsysteme wegen einer möglicherweise geringen Empfindlichkeit des Kurzzeit-Comet Assay für indirekte Gentoxine.

4.5.5 Abschließende Beurteilung des Comet Assay als Umwelt-Gentoxizitätstest

In die Beurteilung des Comet Assay müssen einerseits Aspekte der methodischen Praktikabilität und Ökonomie einfließen, andererseits Aspekte der biologischen Relevanz. Außerdem kann ein Vergleich mit den vorhandenen anderen Gentoxizitätstests gezogen werden. Neben diesen allgemeinen Aspekten besteht immer die Frage nach der Eignung für die jeweilige Fragestellung.

Zur Frage nach der biologischen Relevanz, die in den vorangegangenen Abschnitten gestellt wurde, ist zusammenzufassen, dass Korrelationen positiver Comet-Testergebnisse mit dem Auftreten von Cancerogenität, späterem Zellsterben, Mutationen

und anderen genetischen Schäden bestehen, aber die diesbezügliche Beurteilung bisher aus einer gemischten Datenlage heraus erfolgen muss, denn es sind noch nicht viele Validierungsuntersuchungen zur karzinogenen Wirkung mit größeren Datenmengen vorhanden, und zu Themen wie Zytotoxizität, Biomonitoring und Übereinstimmung mit anderen Gentoxizitätstests nur Untersuchungen kleineren Umfangs. Eindeutig quantifizierbare Aussagen bieten nur die genannten "größeren" Untersuchungen (s. Tab. 34), deren nur grob übereinstimmende Ergebnisse noch in weiteren Experimenten überprüft und gefestigt werden müssen, sofern man die Sicherheit der Aussage statistisch verbessern bzw. genauer machen möchte. Dies folgt einfach aus der statistischen Gesetzmäßigkeit bei komplexen Problemen wie biologischer Relevanz und Karzinogenität. Gleichzeitig wäre aber eine weitere Überprüfung mit mehr Daten und Wiederholungen nur sinnvoll, wenn für eine streng standardisierte Methodik gesorgt wäre. Eine etwas andere Fragestellung ist die Beurteilung einzelner Ergebnisse - im Gegensatz zur allgemeinen Beurteilung der "biologischen Relevanz". Die Beurteilung aus verschiedenen Untersuchungen mit "gemischter" Datenlage ist hier sogar wünschenswert. Z. B. weisen De Maagd und Tonkes (2000) und Madle & Lang (1993) ausdrücklich darauf hin, dass in eine Beurteilung sowohl die quantitativen Ergebnisse aus Vergleichstests als auch die Kenntnis kausaler Zusammenhänge und schließlich die Erfahrung der Anwender einfließen müssen, d. h. es wäre ein Fehler und würde zu wenig Information beinhalten, wenn nur Parameter wie z. B. Konkordanz zur Karzinogenität u.ä. herangezogen würden, selbst wenn sie sicher quantifiziert wären. Aus ähnlichen Gründen sollte auch bei der Validierung eines Tests an sich die Gesamtheit der Daten im Auge behalten werden.

Der Comet Assay ist bezüglich seiner biologischen Relevanz als mindestens ebenso geeignet wie andere gebräuchliche Gentoxizitätstests einzustufen. Mit Tests, die den- bzw. die selben Endpunkte betreffen, steht er diesbezüglich auf der gleichen Stufe. Die Karzinogenitäts-Konkordanz beträgt in den meisten Untersuchungen über 70 %. Für mehrere andere Gentoxizitätstests sind Werte um 60 % gefunden worden, sodass man dies generell als Schätzwert für die Relevanz eines Gentoxizitätstests annehmen könnte (s.o., 4.5.3). Die Tatsache, dass nichtgentoxische Karzinogene nicht detektiert werden können, ist ein Manko, das ganz allgemein alle Gentoxizitätstests betrifft und gegebenenfalls durch Tests ausgeglichen werden müsste, die nichtgentoxische Endpunkte besitzen. Dieses Argument kann also nicht in die spezifische Bewertung einbezogen werden. Wenn man eine Verbreiterung des gentoxischen Detektionsspektrums und damit eine größere Sicherheit anstrebt, ist es ratsam, den Comet Assay mit einem oder weiteren Gentoxizitätstests zu ergänzen, die einen möglichst komplementierenden Endpunkt besitzen. Ein etwas eingeschränktes Detektionsspektrum ist wiederum kein spezifischer Nachteil des Comet Assay gegenüber anderen Gentoxizitätstests, da diese anderen Tests ebenfalls einen eingeschränkten Blick bieten und genauso in ihrem Endpunkt ergänzt werden müssten. Es bestehen aber Unterschiede zwischen den Tests, die bei spezifischen Fragestellungen zum Tragen kommen.

Ebenfalls zum Themenkomplex biologische Relevanz gehört die Möglichkeit, Vorhersagen aus den Testergebnissen abzuleiten. Die Vorhersagefunktion des Comet Assay kann noch nicht abschließend und mit quantitativer Genauigkeit bewertet werden. Es ist klar, dass sich die Expositionsbedingungen von *in vitro*-Zelltests mit dem Comet

Assay von Karzinogenitätstests *in vivo* unterscheiden, sodass viele Untersuchungen keine sichere Beurteilungsgrundlage darstellen. Einige Untersuchungen sind aber vorhanden, z. B. die von Sasaki et al. (2000). Die theoretische Überlegung lässt annehmen, dass der Comet Assay als ein Test für DNA-Primärschäden sensibler reagiert, als letztendlich Folgeschäden entstehen. Vor allem die DNA-Reparatur sollte dann wohl wieder für einen Rückgang der Schäden sorgen, was ja auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen worden ist. Versuchsergebnisse stützen diese Überlegungen: Ein positives Ergebnis im Comet Assay bedeutet noch keine Karzinogenität, aber wo Karzinogenität auftritt, lassen sich meistens im Vorfeld auch Comet Assay positive Ergebnisse finden (Sasaki et al. 2000). Letztendlich ist es also wohl vorwiegend eine Frage der Dosis, Expositionsdauer bzw. -häufigkeit und der spezifischen DNA-Reparaturkapazität der Zellen, ob ein im Comet Assay reproduzierbar detektiertes gentoxisches Potenzial zu einem Schaden führt. "Falsch positive" Ergebnisse entstehen hier wohl nur im quantitativen Sinne der Expositionssituation, also bei unerschwelliger Konzentration. Qualitativ, also substanzspezifisch zeigen die entsprechenden statistischen Parameter "Spezifität" und "positiver Vorhersagewert", basierend z. B. auf Sasaki et al. (2000), dass der Wert von ca. 40 % falsch positiv angezeigten nicht-karzinogenen Substanzen im Comet Assay *in vivo* offenbar im Vergleich mit anderen Testsystemen *nicht* außergewöhnlich hoch, sondern gewissermaßen "normal" ist.

Im Vergleich mit Gentoxizitätstests, die den gleichen Endpunkt und die damit verbundenen gleichen Nachteile besitzen, ist der Comet Assay wegen seiner hohen Sensitivität (im Sinne niedriger Testsubstanzkonzentration) und zusätzlichen Vorteile wohl als der beste Test zu bewerten. Nur Tests mit anderen, sekundären Endpunkten, z. B. Mutationstests oder Tests auf Chromosomenschäden, sollten theoretisch weniger falsch positive Ergebnisse zeigen als der Comet Assay. Anhand eines groben Überblicks der Literatur lässt sich dies allerdings nicht einfach feststellen, weil dies genaue Angaben bzw. Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Effekte erfordern würde. Die vorhandenen Untersuchungen konzentrieren sich eher auf die qualitativ-substanzspezifischen Ergebnisse und dort schneidet der Comet Assay vergleichbar "gut" ab (Spezifität und positiver Vorhersagewert gegenüber Karzinogenität, Tabelle 34, z. B. Sasaki et al. 2000). Unstrittig ist wohl, dass einige der "Sekundärschäden" an sich schon so verheerend sind, dass die betroffenen Zellen absterben, mit unterschiedlichen möglichen Auswirkungen auf den Gesamtorganismus. Zur Beurteilung der Korrelationen der "Sekundärtests" mit der Karzinogenität wäre eine ausführlichere Untersuchung der Literatur notwendig, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit aber überschreiten würde. Wenn dies auf die Konzentrationsabhängigkeit der Effekte ausgedehnt werden sollte, ist sogar fraglich, ob die Untersuchungen solche Daten überhaupt enthalten. Zumindest lässt sich in einigen Fällen des passiven Biomonitorings (also bei freilebenden Populationen) eine generell bessere Korrelation mit Verschmutzungen bei "Sekundärtests" wie dem MNA als beim Comet Assay feststellen (Bombail et al. 2001 und weitere, dort zitierte Untersuchungen). Es kommt dabei sowohl ein Ausbleiben von Schäden in kontaminierten Regionen als auch ein Auftreten von Schäden in nichtkontaminierter Umwelt vor.

Die Uneinheitlichkeit solcher Ergebnisse lässt auf multikausale und komplexe Zusammenhänge schließen. Eine der möglichen Ursachen für eine manchmal fehlende Reaktion im Comet Assay sind vermutlich Anpassungsreaktionen sowohl auf

organismischer als auch auf Populationsebene. Insgesamt ist also ein Biomonitoring mit "Sekundärtests" im obigen Sinne wohl einfacher als mit dem Comet Assay, aber dieser sollte dennoch nicht als "möglicherweise ungeeignet" für das passive Biomonitoring bezeichnet werden, wie in Bombail et al. (2001). Die Erfolge des Comet Assay *in vitro*, aber auch im *in vivo*-Experiment, und die Tatsache, dass auch in Biomonitorings (z. B. in den Arbeiten von Hartmann et al. und zum Teil auch in der vorliegenden Arbeit) positive Testergebnisse und Korrelationen gefunden wurden, lassen darauf schließen, dass der Comet Assay auch im passiven Biomonitoring (freilebende Populationen, *ex vivo*) ein Potenzial besitzt, das ausgeschöpft werden kann, wenn die Eigenheiten des Tests berücksichtigt werden. Darunter fallen auch Freilandversuche unter kontrollierten Bedingungen, wie das *Caging* von Fischen in verschmutzten Gewässern. Was "falsch positive" Ergebnisse bei geringen, aber gentoxischen Konzentrationen angeht, ist zunächst nur die allgemeine Aussage möglich, dass mit weniger biologisch relevanten Folgeschäden zu rechnen ist, als anfänglich angezeigt werden ("Überempfindlichkeit"). Das Manko dieser ungefähren Aussage kann nur behoben werden, indem für jedes Testsystem bzw. jeden Zelltyp spezifische Schwellenwerte für biologisch relevante Folgeschäden bestimmt werden. Bei reproduzierbar positiven Ergebnissen ist aber grundsätzlich von einer gentoxischen Gefährdung auszugehen, die Hinweis für weitere Untersuchungen sein sollte. Darüber hinaus darf der Begriff "Überempfindlichkeit" nicht vergessen lassen, dass davon unabhängig auch immer eine gewisse, das *Substanzspektrum* betreffende Unterempfindlichkeit besteht (die sich in Werten deutlich unter 100 % Sensitivität ausdrückt, s. Tabelle 34, z. B. Sasaki et al. 2000).

Neben der Beurteilung der biologischen Relevanz sind die praktisch-methodischen Aspekte bereits unter 4.5.1 bzw. Anhang 5 detailliert beschrieben und größtenteils unter 4.5.2 beurteilt worden. Die Vorteile lassen sich hier nochmals zusammenfassen:

- 1) hohe Sensitivität (zum Begriff siehe 3.4.2.1),
- 2) nahezu universelle Anwendbarkeit bezüglich der Zelltypen (Tiere, Pflanzen, Bakterien),
- 3) Fähigkeit, Schäden in nicht-proliferierenden Zellen zu detektieren,
- 4) benötigt nur geringe Anzahlen von Zellen,
- 5) Flexibilität (*in vivo/ex vivo*, *in vitro*, aktives und passives Biomonitoring, räumliche und zeitliche Trennbarkeit verschiedener Versuchsschritte etc.)
- 6) einfache Anwendung,
- 7) geringe Dauer zum Ausführen eines kompletten Experiments (*In-vitro*-Versuche benötigten hier ca. 13,5 h),
- 8) geringe laufende Kosten.

Als methodische Nachteile lassen sich

- 1) bisher meist noch geringer Probendurchsatz,
- 2) relativ zur restlichen Methode - arbeitszeitintensive, etwas mühsame und nicht objektive Auswertung (im Vergleich zu anderen Gentoxizitätstests ist die Gesamtdurchführung aber ausdrücklich *nicht* aufwendiger),
- 3) quantitativ relativ hohe inter-experimentelle Varianz (zwischen verschiedenen Elektrophoreseläufen),

4) schwierige Standardisierbarkeit (zur Anwendung in verschiedenen Labors) - weil die relativ hohe inter-experimentelle Varianz hohe Anforderungen an die Methodik zur Konstanthaltung dieser Versuchsbedingungen stellt (s. 4.1.1) -

nennen.

Im Gesamturteil lässt sich Folgendes sagen:

Der Comet Assay ist *in vitro* als Screening-Test für Einzelsubstanzen und Stoffgemische geeignet und kann andere Gentoxizitätstests mit gleichem Endpunkt durchaus als bessere Methode ersetzen. Für eine routinemäßige Anwendung muss aber der Durchsatz erhöht werden und die Methoden zur Konstanthaltung der Versuchsparameter sollten optimiert werden. Soll Vergleichbarkeit zwischen Labors erreicht werden, so wäre die Anwendung einer standardisierten Methodik notwendig.

Die hohe Sensitivität des Comet Assay stellt einen Vorteil und einen Fortschritt in der Gentoxizitätstestung dar, allerdings sind mehr positive Ergebnisse zu erwarten, als letztendlich schwerwiegende Folgeeffekte auftreten werden, da DNA-Primärschäden detektiert werden, die z. B. durch DNA-Reparatur wieder verringert oder rückgängig gemacht werden. Auch in dem Gentoxizitäts-Projekt, zu dem die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beitrugen, war der Comet Assay der am häufigsten positive Test (Grummt 2000). Der Test eignet sich damit zunächst in jedem Fall als Forschungswerkzeug. Ohne dass bisher genaue quantitative Aussagen möglich sind, - also aus welcher Stärke oder Häufigkeit von DNA-Primärschädigungen welche relevanten Schäden für Zellen, Organismen und Populationen hervorgehen - wird doch zumindest ein gentoxisches Potenzial angezeigt, aus dem eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit von Folgeschäden resultiert. Gewisse Korrelationen mit Karzinogenität sind vorhanden. Genauer kann über die Steigerung des Risikos nicht gesagt werden. Für bestimmte Folgeschäden gibt es wohl Schwellenwerte. Es besteht aber auch eine Abhängigkeit von Schwellenwerten in Abhängigkeit der sonstigen Bedingungen wie z. B. zusätzlichen Kontaminationen oder Krankheiten. Somit sind positive Ergebnisse im Comet Assay sicherheitshalber als relevant zu betrachten, solange mit anderen, unkalkulierbaren Größen zu rechnen ist. Genauere Vorhersagefunktion kann der Comet Assay nur erlangen, wenn weitere, spezifische Untersuchungen gemacht werden.

Ein Urteil über den "besten" Test kann nicht getroffen werden, sofern nicht derselbe gentoxische Endpunkt betrachtet wird und/oder die Abhängigkeit von der Fragestellung mit einbezogen wird. Die Wahl des bzw. der gentoxischen Endpunkte sollte von der Fragestellung abhängen, und der gentoxische Endpunkt ist wiederum auch mit der biologischen Relevanz verknüpft. Eine Festlegung dieser Punkte vorausgesetzt, sollte man sich für den praktikabelsten, schnellsten, flexibelsten (etc.) Test entscheiden. Dass der Comet Assay hier eine gute Wertung erreicht, wurde bereits gesagt. Sowohl in der Umwelt- als auch in der Substanztestung mit Zellen bzw. Organismen ist es aber sinnvoll, sich wegen der Komplexität der Systeme nicht nur auf *einen* Endpunkt zu beschränken. Zur Steigerung der Detektionsquote und der Aussagesicherheit sollte der Comet Assay daher in einer Testkombination angewendet werden. Dabei sollten ein oder mehrere andere zusätzliche Gentoxizitätstests angewandt werden, deren Endpunkte möglichst wenig mit dem des Comet Assay und miteinander überlappen

(Komplementarität der Tests). In einem hierarchischen Stoffprüfungsverfahren könnte der Comet Assay einerseits Verdachtsmomente liefern, andererseits bräuchten unverdächtige Substanzen ausschließlich als letzte Absicherung in einem *in vivo*-Karzinogenitätstest geprüft werden, also wenn die vorausgegangenen Gentoxizitätstests negativ waren.

Im Hinblick auf die Umwelttestung ist zu sagen, dass mit dem biologischen Organisationsniveau der Endpunkte (z. B. Primärschäden am Erbmateriel, Sekundärschäden am Erbmateriel, Organschäden durch Krebs) natürlich die biologische Relevanz der Testergebnisse parallel einhergeht und dass daher die Priorität auch auf entsprechenden Tests liegen muss, wenn denn solche Schäden in der Umwelt zu erwarten bzw. festgestellt worden sind. Das Auftreten oder Ausbleiben von DNA-Primärschäden bei freilebenden Organismen lässt dagegen keine eindeutigen Schlüsse über Folgeschäden zu. Günstiger verhält sich dies, wenn die Primärschäden unter kontrollierten Bedingungen, z. B. *in vitro*, getestet werden. Mit diesbezüglichen Methoden, wie dem Comet Assay, sind einem besonders sensible "Messgeräte" an die Hand gegeben, die in Situationen geringerer (diffuser) bzw. weit entfernter Kontaminationen eingesetzt werden können, gleichzeitig aber auch stärkere Kontaminationen detektieren können.

In nicht vollständig kontrollierbaren Biomonitoring-Situationen (passives Biomonitoring) kann der Test zwar nicht immer zu direkten Schlussfolgerungen führen, aber zumindest Zusatzinformationen liefern. Wenn der Comet Assay aber *in vitro* eingesetzt wird, oder wenn zuvor unbelastete Organismen an die Umweltprobe/-situation exponiert werden (aktives Biomonitoring), können Anpassungsreaktionen, die das Testergebnis verfälschen, größtenteils ausgeschlossen werden. In diesen Fällen besitzt der Test also einen hohen Wert und ein großes Potenzial in der Umwelttestung.

Wenn man mit molekularbiologischen Methoden zur Detektion von Gentoxizität vergleicht (z. B. Sequenzbestimmung eines normalen oder mutierten Gens oder Bestimmung veränderter DNA-Banden durch RAPD - random amplified polymorphic DNA), so können diese ebenfalls hohe Sensitivität und Spezifität erreichen, allerdings liegen diese Methoden oft auf einem niedrigen biologischen Organisationsniveau, d. h., sie detektieren Primärschäden, deren biologische Relevanz nicht klar bekannt ist. Außerdem ist das Detektionsspektrum bei Sequenzveränderungen so eng (nur bestimmte DNA-Abschnitte), dass neben der spezifischen Aussage kaum weitere Aussagen gemacht werden können. Die RAPD-Methode ist wohl in der Lage, DNA-Veränderungen teilweise bis auf Punktmutationsniveau anzuzeigen, jedoch hängen die Ergebnisse eben "zufällig" von den verwendeten Primern etc. ab, sodass die Methode bezüglich Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit problematisch sein kann. Daher erscheinen solche Tests für die Praxis der Umwelttestung, speziell des Screenings, noch eher ungeeignet. Die Geräte für solche Methoden können auch sehr teuer sein. Der Comet Assay sollte also seinen festen Platz in der Umwelttestung bekommen und weiterentwickelt werden. Er kann andere Testsysteme ergänzen und zum Teil sogar ersetzen.

4.6 Ausblicke

Die Entwicklung der letzten Jahre scheint den genannten Vorteilen des Comet Assay Rechnung zu tragen, seine Verbreitung und die Anzahl der Veröffentlichungen hat allgemein und auch im Bereich der Ökotoxikologie stark zugenommen. Auch und vor allem molekularbiologische Verfahren werden weiterentwickelt und zum Teil kostengünstiger. Die dabei oft anfallenden Informationsmengen werden durch entsprechende Entwicklungen in der Datenverarbeitung aufgefangen. Mit entsprechendem Aufwand werden sich die vielen Einzelinformationen aus molekularbiologischen Verfahren im Computer zu einem Gesamtmodell zusammensetzen lassen. Der Comet Assay liefert dagegen eine „biologische Integration“ der Informationen, die in der praktischen Anwendung im Verhältnis zum Aufwand immer noch stabiler, kostengünstiger und flexibler. Für die Grundlagenforschung scheint eine Kombination des Comet Assay mit solchen Methoden vielversprechend zu sein.

Um die inter-experimentelle Reproduzierbarkeit und damit zusammenhängend die Standardisierbarkeit des Comet Assay weiter zu entwickeln und zu verbessern, könnten grundlegende Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Elektrophorese im Mikrobereich einfließen. Von solchen Forschungen sollte man z. B. eine Verbesserung der Homogenität der DNA-Wanderung auf verschiedenen Objektträgern erwarten. Zur methodischen Verbesserung der Konstanz der Laborfaktoren könnten evtl. exakt temperierbare Inkubations- und Elektrophoresekammern sowie die Verwendung von standardisierten oder auf ihre Konzentration getesteten Positivkontrollsubstanzen beitragen. Auch die Messgenauigkeit der *in vitro*-Zelldichte bei der Einsaat und zum Zeitpunkt der Inkubation sollte auf ihre Genauigkeit hin untersucht und die Konstanz optimiert werden.

Zur Automatisierung des Comet Assay sind, neben den bereits unter 4.5.2 und Anhang 5 genannten Arbeiten weitere Arbeiten hinzugekommen. So ist inzwischen ein automatisch ausgewerteter Comet Assay auf 96-Loch-Platten möglich (Stang & Witte 2009; Stang et. al. 2010). Denkbar sind eventuell auch Rationalisierungsmethoden wie die Veränderung der Anzahl auszuwertender Zellen. Da damit eine Beeinflussung der Sensitivität oder statistischen Sicherheit verbunden ist, könnten solche Berechnungen in Software integriert werden, die zuvor z. B. auch mit den "historischen" Labordaten gespeist wurde. Solch eine Software könnte wiederum zur Standardisierbarkeit (Vergleich mit anderen Labors) beitragen.

Die Einsatzgebiete des Comet Assay sind - wie dargestellt - vielfältig. Wegen seiner Sensitivität und seines Endpunktes (Detektion von DNA-Primärschäden) scheint es weiterhin vielversprechend zu sein, ihn zu spezialisierten Forschungszwecken betreffs DNA-Strangbrüchen und DNA-Reparatur einzusetzen. In reinen Gentoxizitäts-Testbatterien können Informationen geliefert werden, die das "Frühstadium" der Gentoxizität betreffen und die daher Tests auf sekundäre gentoxische Wirkungen sinnvoll ergänzen. Der Comet Assay scheint geeignet zu sein, andere Testsystemkandidaten mit gleichem oder ähnlichem Endpunkt zu ersetzen. Um das Ergebnis noch spezifischer zu machen, könnte im Falle positiver Comet Assay-Testergebnisse DNA aus der Zellprobe isoliert werden und auf spezifische Addukte oder Mutationen mit der ³²P-Postlabeling-Technik, mit Sequenzierungstechniken, PCR-

Analysen zu SNPs (single nucleotide polymorphisms) untersucht werden, um Hinweise auf verursachende Substanzen zu bekommen. Eventuell könnte so auch die Beurteilung erleichtert werden, weil einige Addukte bekanntermaßen gefährlicher sind als andere. Dies leitet dann zu noch notwendigen Untersuchungen über die biologische Relevanz über.

Zur Verbesserung des Wissens über die biologische Relevanz wäre z. B. die Übereinstimmung *in vitro*-Comet Assay/*in vivo*-Karzinogenität von Interesse. Im Falle von Blutproben ("*ex vivo*") wäre sogar eine Beobachtung an denselben Individuen möglich. Diese Untersuchungen der biologischen Relevanz wären allerdings etwas aufwendig, z. B. was das Monitoring und die Kontrolle über einen längeren Zeitraum, große Anzahlen von untersuchten Tieren etc. betrifft. Andererseits haben Versuche zur Leberkrebsinduktion mit Massen von Tieren (ca. 40000; Williams 2012) gezeigt, dass offenbar gerade die Regenbogenforelle für Großuntersuchungen geeignet ist. Ein anderer Ansatz in Richtung biologische Relevanz wäre die parallele Analyse der Comet Assay Reaktion im Vergleich zur Schädigung ganz bestimmter Gene, z. B. Onkogene. Dazu wäre der Einsatz genspezifischer molekularbiologischer Methoden notwendig. Tatsächlich sind inzwischen Untersuchungen gemacht worden, bei denen parallel Comet Assay und Genexpressionsanalyse mit Hilfe von qRT-PCR oder Microarrays ("DNA Chips") durchgeführt wurden (Lourenco et al. 2013; Di et al. 2011). Ein Einsatz der "Random Amplified Polymorphic DNA"-Technik (RAPD) ist für spezifische Untersuchungen leider nicht geeignet, obwohl er prinzipiell Mutationen einzelner DNA-Basen anzeigen kann. Wie der Comet Assay lässt er keine Rückschlüsse auf die genaue Sequenz oder den Ort auf dem Chromosom zu. Eine Kombination des Comet Assay mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) kann jedoch Aufschluss über die Schädigung bestimmter Chromosomen geben (Santos, et al. 1997; Harreus et al. 2004).

Die auf zellbiologischer Seite wichtigsten Einflüsse im Comet Assay sind die DNA-Reparatur und die Metabolisierung gentoxischer Substanzen durch die Zellen. Auf diesen Gebieten besteht ebenfalls noch weiterer Forschungsbedarf. Hier wären z. B. Langzeituntersuchungen über das Schicksal von Zellen *in vitro* nach gentoxischer Exposition und erfolgter Reparatur sinnvoll. Bezogen auf die vorliegende Arbeit: Was geschieht nach ein paar Tagen mit den RTG-2-Zellen, die zunächst nach einem Tag eine scheinbar vollständige DNA-Reparatur gezeigt haben, gibt es Zytotoxizität oder Entartung? Mit weiteren Inhibitionsversuchen könnte erforscht werden, ob unterschiedliche stoff- bzw. schädigungsspezifische DNA-Polymerasen bei den unterschiedlichen gentoxischen Stoffen für die DNA-Reparatur verantwortlich sind (z. B. radikalisch erzeugte Strangbrüche versus Strangbrüche durch spezifische Addukte). Interessant sowohl für die Gentoxizitätstestung als auch für das Feld der DNA-Reparatur wäre auch ein genauer Vergleich zwischen Comet Assay und UDS-Test. Weitere Ansätze in Bezug auf die DNA-Reparatur sind bereits unter 4.3.2.4 genannt worden.

Zur Erforschung der Metabolisierung wäre es z. B. sinnvoll, die begonnenen Versuche auszubauen (vorl. Arbeit u. (Nehls & Segner 2001), indem Metabolisierungs-Hemmstoffe eingesetzt und deren Einfluss auf Gentoxizität und gemessene Metaboliten untersucht würden. Dies würde Aufschluss über die Ursachen der zelltypspezifischen Unterschiede von DNA-Schädigungen geben. Bei NQO wären dies Hemmversuche mit Dicoumarol (Inhibitor der DT Diaphorase). Auch ein Vergleich mit der Crosslinker-Substanz

Mitomycin C (MMC) wäre interessant, da die Moleküle Chinon enthalten und so ebenfalls von DT-Diaphorase aktiviert werden. Neben der Erweiterung des Wissens über die Metabolisierungskapazitäten sollten solche Forschungen auch dazu beitragen, solche Zellen zur *in vitro*-Testung zu verwenden, die den letztendlich interessierenden Zellen in Bezug auf gentoxische Empfindlichkeit möglichst nahekommen oder die bestimmte Gentoxine besonders empfindlich detektieren. Untersuchungen wie die in der vorliegenden Arbeit gemachten Versuche zu RTG-2- und RTL-W1-Zellen sollten also vertieft werden.

Ein Einsatz - wie in der vorliegenden Arbeit (siehe auch Brack et al. 1999 und Devaux et al. 1998, Flammarion et al. 2002) - in "universellen" Biotestbatterien oder im Biomonitoring mit unterschiedlichen Endpunkten, Biomarkern und Organismen bietet sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an. Durch Nachuntersuchungen und Verfeinerungen wie oben genannt, und durch ergänzende und zielgerichtete chemische Analytik (wie in der vorliegenden Arbeit im "TIE-Verfahren") könnte die Suche nach gentoxischen Komponenten in der Umwelt und ihren Quellen weiterentwickelt werden.

Der Comet Assay zur Testung von Substanzen bzw. Proben (Gemischen) *in vitro* stellt also das Einsatzgebiet dar, das naturgemäß besser kontrollierbare Bedingungen bietet als Biomonitoring-Situationen und die Detektion von primären gentoxischen Reaktionen scheint mehr in die Grundlagenforschung als in den angewandten Bereich zu weisen. Dennoch sind die grundsätzlichen Probleme des Freiland-Biomonitorings ebenso bei anderen Gentoxizitätstests vorhanden und die Detektion einer Primärreaktion kann im Sinne eines Frühwarnsystems im Biomonitoring erwünscht sein.

Im Freiland-Biomonitoring ist der Comet Assay zwar von der Praktikabilität her gut geeignet, jedoch ist die Bedeutung der Ergebnisse vor allem beim passiven Biomonitoring (Definition s. Einleitung, 1.3) manchmal unklar. Zur Identifikation bestimmter verursachender Substanzen könnten oben erwähnte Ansätze einer "Toxicity Identification and Evaluation" verfolgt werden, bei denen ein zunächst breit angelegtes Untersuchungsrastrer immer stärker verengt wird. Dies wird aber wegen Kombinationswirkungen nur begrenzt praktikabel sein, andererseits ist es ja gerade die Stärke des Comet Assay, Wirkungen komplexer Gemische und Kombinationswirkungen anzuzeigen, die einer Einzelanalytik entgehen. Dies wurde z. B. auch jüngst bei einem Freiland-in-situ-Biomonitoring an Fischen aus dem Nil gezeigt (Osman et al. 2012). Wegen des labortechnisch geringen Aufwandes bei gleichzeitig direkter Aussage über den Zustand in natürlichen Populationen sollten derartige Untersuchungen häufiger und regelmäßiger durchgeführt werden, eine Blutuntersuchung ohne tödliche Folgen bietet sich auch als minimal-invasive Methode unter Berücksichtigung des Tier- und Artenschutzes an.

Um auch in Freilandversuchen eine gewisse Kontrollierbarkeit zu erreichen, z. B. um Schwankungen unter den Tieren aufgrund eines bestimmten Such- oder Schwimmverhaltens in Bezug auf Futter und Kontaminationen gering zu halten, können z.B. auch Fische in Caging-Versuchen ausgesetzt und später untersucht werden, anstatt auf freie Wildpopulationen zurückzugreifen. So könnten manche gentoxische Belastungssituation möglicherweise besser festgestellt werden, wobei natürlich die Aussage über den Zustand in der Wildpopulation verloren ginge.

Die Varianten, den Comet Assay im aquatischen Biomonitoring einzusetzen, sind also vielfältig und besitzen ebenso vielfältige Schwerpunkte. Alle Varianten sind geeignet, um Informationen über die gentoxische Belastung eines Gewässers oder der darin lebenden Organismen zu gewinnen. Viele dieser Varianten wurden bereits eingesetzt, und nur wenige der hier geäußerten Ideen sind noch nicht ausprobiert worden. In der Gentoxizitätstestung, wie sie beispielsweise für die Prüfung produzierter Substanzen im Rahmen der REACH-Verordnung notwendig ist, hat der Comet Assay zwar noch nicht den Stellenwert einer Standardmethode wie z. B. der Ames-Test oder Mikronukleus-Assay, jedoch wurden und werden Richtlinien erarbeitet, die wohl schließlich den Comet Assay neben diesen Methoden in die Sammlung der "OECD Guidelines for the Testing of Chemicals" stellen werden (Tice et al. 2000; Burlinson et al. 2007; OECD 2013). Die *in vitro*-Gentoxizitätstests kommen als Alternativmethoden zur Reduzierung von Tierversuchen - welche auch im Rahmen von REACH gefordert ist - in Frage (Wagner et al. 2012)

Im aquatischen Biomonitoring muss sicher die Plausibilität und Validität der Ergebnisse jeweils abgewogen werden, aber gerade als empfindliches Frühwarnsystem sollten positive Testergebnisse zumindest entweder zu einer erhöhten Aufmerksamkeit, weiteren Prüfungen durch andere Tests oder eventuell sogar direkt zu Verbesserungsmaßnahmen der Umweltsituation führen.

5. Literatur

- Ahlf,W, Dahn,M, Förstner,U, Wild-Metzko,S (1991): Biologisches Bewertungskonzept für Sedimente. Vom Wasser 76, 215-223.
- Ahmed,S, Mahrous,K, El-Sobhy,H (1998): Cytogenetic study of buffalo under pollution of environmental conditions. Mutation Res. 419, 21-26.
- Ahnström,G, Erixon,K (1973): Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution. Int. J. Radiat. Biol. 23, 285-289.
- AK Bioindikation der Fachgruppe "Umweltchemie und Ökotoxikologie" der GDCh (1996): Begriffsdefinitionen zur Bioindikation. UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 8, 169-171.
- Alberts,B, Bray,D, Lewis,J, Raff,M, Roberts,K, Watson,JD (1994): Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. Garland, New York, London.
- Ali,F, Lazar,R, Haffner,D, Adeli,K (1993): Development of a rapid and simple genotoxicity assay using a Brown Bullhead fish cell-line: Application to toxicological surveys of sediments in the Huron-Erie corridor. J. Great Lakes Res. 19, 342-351.
- Al-Sabti,K (1992): Micronuclei induction in pike (*Esox lucius*) in Swedish lakes contaminated with radiocaesium. Cytobios 70, 27-32.
- Al-Sabti,K (1992): Monitoring the genotoxicity of radiocontaminants in Swedish lakes by fish micronuclei. Cytobios 70, 101-106.
- Al-Sabti,K, Hardig,J (1990): Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic sea, Sweden. Comp. Biochem. Physiol. 97C, 179-182.
- Ames,BN, Durston,WE, Yamasaki,E, Lee,FD (1973): Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1553-1557.
- Ames,BN, McCann,J, Yamasaki,E (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Res. 31, 347-364.
- Anderson,D, Yu,TW, McGregor,DB (1998): Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. Mutagenesis 13, 539-555.
- Ashby,J, Tinwell,H, Lefevre,PA, Browne,MA (1995): The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. Mutagenesis 10, 85-90.
- Ashley,LM, Halver,JE (1968): Dimethylnitrosamine-induced hepatic cell carcinoma in rainbow trout. J. Natl. Cancer Inst. 41, 531-552.
- Babich,H, Goldstein,SH, Borenfreund,E (1990): *In vitro* cyto- and genotoxicity of organomercurials to cells in culture. Toxicology Letters 50, 143-149.
- Bailey,GS; Williams,DE; Hendricks,JD (1996): Fish models for environmental carcinogenesis: The rainbow trout. Environ. Health Perspect. 104, Supplement 1, 5-21.
- Bailleul,B, Daubersies,P, Galiègue-Zouitina,S, Loucheux-Lefebvre,M-H (1989): Molecular Basis of 4-Nitroquinoline 1-Oxide Carcinogenesis. Jpn. J. Cancer Res. 80, 691-697.
- Bauer,E, Recknagel,RD, Fiedler,U, Wollweber,L, Bock,C, Greulich,KO (1998): The distribution of the tail moments in single cell electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a Gaussian distribution. Mutation Res. 398, 101-110.
- Baumann,PC, Smith,WD, Parland,WK (1987): Tumor frequencies and contaminant concentrations in brown bullheads from an industrialized river and a recreational lake. Trans. Amer. Fish. Soc. 116, 79-86.
- Baumann,PC (1998): Epizootics of cancer in fish associated with genotoxins in sediment and water. Mutation Res. 411, 227-233.
- Baumann,PC (1989): PAH, metabolites and neoplasia in feral fish populations. In: Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. (Ed: Varanasi,U) CRC Press, Boca Raton, FL, 269-289.
- Baumann,PC, Harshbarger,JC (1995): Decline in liver neoplasms in wild brown bullhead catfish after coking plant closes and environmental PAHs plummet. Environ. Health Perspect. 103, 168-170.
- Bechtel,DG, Lee,LEJ (1994): Effects of aflatoxin B1 in a liver cell line from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxic. *in vitro* 8, 317-328.
- Behrens,Anja, Schirmer,Kristin, Bols,Nils C, Segner,Helmut (2001): Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. Environmental Toxicology and Chemistry 20, 632-643.
- Beland,FA, Dooley,KL, Jackson,CD (1982): Persistence of DNA adducts in rat liver and kidney after multiple doses of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. Cancer Res. 42, 1348-1354.
- Belpaeme,K, Delbeke,K, Zhu,L, Kirsch-Volders,M (1996): Cytogenetic studies of PCB 77 brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. Mutagenesis 11, 485-492.

- Benford,DJ, Reavy,HJ, Hubbard,SA (1988): Metabolizing systems in cell culture cytotoxicity tests. *Xenobiotica* 18, 649-656.
- Benigni (1992): Relationships between *in vitro* mutagenicity assays. *Mutagenesis* 7, 335-341.
- Bertazzi,PA, Bernucci,I, Brambilla,G, Consonni,D, Pesatori,AC (1998): The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. *Environ. Health Perspect.* 106, 625-633.
- Betti,C, Davini,T, Gianessi,L, Loprieno,N, Barale,R (1994): Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Res.* 307, 323-333.
- Binetti R, Costamagna FM, Marcello I. (2008): Exponential growth of new chemicals evolution of information relevant to risk control. *Ann Ist Super Sanita* 44:13-15.
- Black,JJ (1983): Field and laboratory studies of environmental carcinogenesis in Niagara River fish. *J. Great Lakes Res.* 9, 326-334.
- Black,JJ, Evans,ED, Harshbarger,JC, Zeigel,RF (1982): Epizootic neoplasms in fishes from a lake polluted by copper mining wastes. *J. Natl. Cancer Inst.* 69, 915-926.
- Bliefert,C (1994): Umweltchemie. VCH, Weinheim.
- Bock,C, Dittmar,H, Gemeinhardt,H, Bauer,E, Greulich,KO (1998): Comet assay detects cold repair of UV-A damages in a human B-lymphoblast cell line. *Mutation Res.* 408, 111-120.
- Bocker,W, Rolf,W, Bauch,T, Muller,WU, Streffer,C (1999): Automated comet assay analysis. *Cytometry* 35, 134-144.
- Bombail,V, Aw,D, Gordon,E, Batty,J (2001): Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 44,3, 383-392.
- Brack,W, Altenburger,R, Ensenbach,U, Möder,M, Segner,H, Schüürmann,G (1999): Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) - a contribution to hazard assessment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 164-174.
- Brack,W, Altenburger,R, Ensenbach,U, Möder,M, Segner,H, Schüürmann,G (1999): Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) - a contribution to hazard assessment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 164-174.
- Brack,W, Altenburger,R, Ensenbach,U, Nehls,S, Segner,H, Schüürmann,G (2000): Wirkungsorientierte Identifikation toxischer organischer Inhaltsstoffe in Flusssedimenten. In: Stoffhaushalt von Auenökosystemen - Böden und Hydrologie, Schadstoffe, Bewertungen. (Eds: Friese, Witter, Miehllich, Rode) Springer-Verlag, Berlin?, ?-?
- Bradley,MO, Taylor,VI, Armstrong,MJ, Galloway,SM (1987): Relationships among cytotoxicity, lysosomal breakdown, chromosome aberrations, and DNA double-strand breaks. *Mutation Res.* 189, 69-79.
- Bunton,TE (1996): Experimental chemical carcinogenesis in fish. *Toxicol. Pathol.* 24(5), 603-618.
- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A (2007): Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutation research* 627:31-35.
- Cebula,TA (1995): Chapter 2: Allele-specific hybridization and polymerase chain reaction (PCR) in mutation analysis: The *Salmonella typhimurium* his paradigm. In: Applications of molecular biology in environmental chemistry. (Eds: Minear,Roger A, Ford,AM, Needham,LL) CRC Press, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 11-33.
- Clark,RC Jr, MacLeod,WD Jr (1977): Inputs, transport mechanisms, and observed concentrations of petroleum in the marine environment. In: Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Marine Environments and Organisms. Vol. 1. (Ed: Malins,DC) Academic Press, New York, 91-223.
- Clark,RC Jr, MacLeod,WD Jr (1977): Inputs, transport mechanisms, and observed concentrations of petroleum in the marine environment. In: Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Marine Environments and Organisms. Vol. 1. (Ed: Malins,DC) Academic Press, New York, 91-223.
- Coccia,P, Salmona,M, Diomede,LLC, Citti,L, Mariani,L, Romano,M (1988): Liver DNA alkylation after a single carcinogenic dose of dimethylnitrosamine to newborn and adult CFW Swiss Mice. *Chem.-Biol. Interactions* 68, 259-271.
- Collins,A, Dusinska,M, Franklin,M, Somorovska,M, Petrovska,H, Duthie,S, Filion,L, Panayiotidis,M, Raslova,K, Vaughan,N (1997): Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30, 139-146.
- Collins,AR, Dobson,VL, Dusinska,M, Kennedy,G, Stetina,R (1997): The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Res.* 375, 183-193.
- Conney,AH, Chang,RL, Jerina,DM, Wei,SJC (1994): Studies on the metabolism of benzo(a)pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite. *Drug Metabolism Reviews* 26 (1&2), 125-163.

- Cook,PR, Brazell,IA, Jost,E (1976): Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J. Cell Sci.* 22, 303-324.
- Dankberg,F, Persidsky,MD (1976): A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function. *Cryobiology* 13, 430-432.
- De Boeck,M, Touil,N, De Visscher,G, Vande,PA, Kirsch-Volders,M (2000): Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutation Res.* 469, 181-197.
- De Boeck,M, Touil,N, De Visscher,G, Vande,PA, Kirsch-Volders,M (2000): Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutation Res.* 469, 181-197.
- De Flora,S, Vigano,L, D'Agostini,FD, Camoirano,A, Bagnasco,M, Bennicelli,C, Melodia,F, Arillo,A (1993): Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Res.* 319, 167-177.
- De Flora,S, Zanacchi,P, Bennicelli,C, Arillo,A (1982): Influence of liver S-9 preparations from rats and rainbow trout on the activity of four mutagens. *Toxicology Letters* 10, 345-349.
- de Maagd,PGN, Tonkes,M (2000): Selection of genotoxicity tests for risk assessment of effluents. *Environ. Toxicol.* 15, 81-90.
- Degan,P, Montesano,R, Wild,CP (1988): Antibodies against 7-methyldeoxyguanine: its detection in rat peripheral blood lymphocyte DNA and potential applications to molecular epidemiology. *Cancer Res.* 48, 5065-5070.
- Denissenko,MF, Pao,A, Tang,MS, Pfeifer,GP (1996): Preferential formation of Benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science* 274, 430-432.
- Devaux,A, Pesonen,M, Monod,G (1997): Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicology in vitro* 11, 71-79.
- Devaux,A, Flammarion,P, Bernadon,V, Garric,J, Monod,G (1998): Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Mar. Environ. Res.* 46, 257-262.
- Deventer,K (1996): Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 911-918.
- Di Giulio,RT, Washburn,PC, Wenning,RJ, Winston,GW, Jewell,CS (1989): Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 1103-1123.
- Diamond,L, Clark,HF (1970): Comparative studies on the interaction of Benzo[a]pyrene with cells derived from poikilothermic and homeothermic vertebrates. I. Metabolism of Benzo[a]pyrene. *J. Natl. Cancer Inst.* 45, 1005-1011.
- DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (Ed.) (1990): DIN-Taschenbuch 230: Abwasser-Analyseverfahren. Normen. Wasserhaushaltsgesetz. Abwasser-Verwaltungsvorschriften. 2nd ed. Beuth, Berlin.
- DIN UA 12 Gelbdruck (1994): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Suborganismische Testverfahren (Gruppe T). Bestimmung des erbgutverändernden Potenzials von Wasser und Abwasser mit dem umu-Test - 38415, T 3.
- Di Y, Schroeder DC, Highfield A, Readman JW, Jha AN. (2011): Tissue-specific expression of p53 and ras genes in response to the environmental genotoxicant benzo(alpha)pyrene in marine mussels. *Environmental science & technology* 45:8974-8981.
- Dunn,BP, Black,JJ, Maccubbin,A (1987): 32P-Postlabeling analysis of aromatic DNA adducts in fish from polluted areas. *Cancer Res.* 47, 6543-6548.
- Eckl,PM (1995): Aquatic genotoxicity testing with rat hepatocytes in primary culture. II. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations. *Sci. Total Environ.* 159, 81-89.
- Elia,MC, Storer,RD, Harmon,LS, Kraynack,AR, McKelvey,TW, Hertzog,PR, Keenan,KP, DeLuca,JG, Nichols,WW (1993): Cytotoxicity as measured by trypan blue as a potentially confounding variable in the *in vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay. *Mutation Res.* 291, 193-205.
- Erbes,M, Weßler,A, Obst,U, Wild,A (1997): Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30, 448-458.
- Erdinger,L, Dürr,M, Grummt,T (2000): Use of the Ames test for the examination of surface water. In: Forschungsverbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" 1995-1999. (Ed: Grummt,T) Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung, Außenstelle Dresden, Dresden, 115-139.
- Ericson,G, Lindesjö,E, Balk,L (1998): DNA adducts and histopathological lesions in perch (*Perca fluviatilis*) and northern pike (*Esox lucius*) along a polycyclic aromatic hydrocarbon gradient on the Swedish coastline of the Baltic Sea. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 55, 815-824.
- Ericson,G, Lindesjö,E, Balk,L (1998): DNA adducts and histopathological lesions in perch (*Perca fluviatilis*) and northern pike (*Esox lucius*) along a polycyclic aromatic hydrocarbon gradient on the Swedish coastline of the Baltic Sea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 815-824.

- Ernst,WHO, Peterson,PJ (1994): The role of biomarkers in Environmental Assessment. (4). Terrestrial plants. *Ecotoxicology* 3, 180-192.
- Fadlallah,S, Lachapelle,M, Krzystyniak,K, Cooper,S, Denizeau,F, Guertin,F, Fournier,M (1994): O6-methylguanine-DNA adducts in rat lymphocytes after *in vivo* exposure to N-nitrosodimethylamine (NDMA). *Int. J. Immunopharmac.* 16, 583-591.
- Fairbairn,DW, Olive,PL, O'Neill,KL (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Res.* 339, 37-59.
- Falkmer,S, Marklund,S, Mattsson,PE, Rappe,C (1978): Hepatomas and other neoplasms in the atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*): a histopathologic and chemical study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 298, 342-355.
- Farber,E, Sarma,DSR (1987): Biology of disease-hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. *Laboratory Investigations* 56, 4-22.
- Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W. (2011): Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *Journal of molecular cell biology* 3:44-50.
- Fish,F, Lampert,I, Halachmi,A, Riesenfeld,G, Herzberg,M (1987): The SOS chromotest kit: A rapid method for the detection of genotoxicity. *Toxic. Assessment* 2, 135-147.
- Fisk,S, Sanderson,DC (1999): Chernobyl-derived radiocesium in heather honey and its dependence on deposition patterns. *Health. Phys.* 77, 431-435.
- Flammarion,P, Camus,JC, Devaux,A, Garric,J, Lafont,M, Migeon,B, Mouthon,J (1998): Validation d'indicateurs biologiques de la contamination des écosystèmes hydriques dulcalquicoles et de ses effets toxiques: Biomarqueurs et bioindicateurs mesurés dans la Moselle amont Campagnes de 1998. Cemagref, Département Gestion des Milieux Aquatiques, Division Biologie des Ecosystèmes Aquatiques, Lyon.
- Flammarion,P, Devaux,A, Nehls,S, Migeon,B, Noury,P, Garric,J (2002): Multi-biomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 145-153.
- Flammarion,P, Garric,J (1999): A statistical approach for classifying the extent of EROD induction of fish sampled in clean and contaminated waters. *Wat. Res.* 33, 2683-2689.
- Floyd,DN, Cassoni,AM (1994): Rapid measurement of DNA damage at low doses of radiation: experience with the comet assay. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 126.
- Fong,AT, Hendricks,JT, Dashwood,RH, van Winkle,S, Bailey,GS (1988): Formation and persistence of ethylguanine in liver DNA of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) treated with diethylnitrosamine by water exposure. *Food Chem. Toxicol.* 26, 699-706.
- Forth,W, Henschler,D, Rummel,W, Starke,K (Eds.) (1996): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. 7. Aufl. ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Franic,Z, Lokobauer,N, Marovic,G (1999): Radioactive contamination of cistern waters along the Croatian coast of the Adriatic sea by ⁹⁰Sr. *Health. Phys.* 77, 62-66.
- Frenzilli,G, Betti,C, Davini,T, Desideri,M, Fornai,E, Giannessi,L, Maggiorelli,F, Paoletti,P, Barale,R (1997): Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis. *Mutation Res.* 375, 117-123.
- Froschauer,Alexander (1998): *In vivo*-Untersuchungen an *Danio rerio* zum Nachweis gentoxischer Effekte im Comet Assay. Diplom Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Fry,JR (1982): Activation systems in tissue culture toxicity studies. *Toxicology* 25, 1-12.
- Gagné,F, Blaise,C (1995): Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal* 10, 217-229.
- Gagne,F, Blaise,C (1997): Evaluation of cell viability, mixed function oxidase activity, metallothionein induction, and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes exposed to industrial effluents: II. Validation of the rainbow trout hepatocyte model for ecotoxicity testing of industrial wastewater. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal* 12, 305-314.
- Galiegue-Zouitina,S, Bailleul,B, Loucheux-Le-Febvre (1985): Adducts from *in vivo* action of the carcinogen 4-hydroxy-aminoquinoline 1-oxide in rats and from *in vitro* reaction with 4-acetoxyminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. *Cancer Res.* 45, 520-525.
- Galloway,SM, Miller,JE, Armstrong,MJ, Bean,CL, Skopek,TR, Nichols,WW (1998): DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens. *Mutation Res.* 400, 169-186.
- Garcia Martinez,P, Hajos,AKD, Livingstone,DR, Winston,GW (1992): Metabolism and mutagenicity of 4-nitroquinoline N-oxide by microsomes and cytosol of digestive gland of the mussel *Mytilus edulis* L. *Mar. Environ. Res.* 34, 303-307.
- Garcia Martinez,P, Winston,GW, Metash-Dickey,C, O'Hara,SCM, Livingstone,DR (1995): Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Toxicology and Applied Pharmacology* 131, 332-341.

- Gedik,CM, Ewen,SWB, Collins,AR (1992): Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 313-320.
- George,SE, Allison,JC, Brooks,LR, Eischen,BT, Kohan,MJ, Warren,SH, King,LC (1998): Modulation of 2,6-dinitrotoluene genotoxicity by alachlor treatment of Fischer 344 rats. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 274-281.
- Glos,M, Braunbeck,T, Deventer,K, Miltenburger,HG, Nehls,S, Obst,U, Schnurstein,A, Segner,H, Wessler,A (2000): The comet assay as a tool to detect the genotoxic potential of surface water samples: *in vivo* and *in vitro* assays using green algae, protozoa, molluscs, fish, as well as primary and permanent cell cultures from fish and mammals. In: Forschungsverbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" 1995-1999. (Ed: Grummt,T) Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung, Außenstelle Dresden, Dresden, 97-114.
- Godard,T, Deslandes,E, Lebailly,P, Vigreux,C, Poulain,L, Sichel,F, Poul,JM, Gauduchon,P (1999): Comet assay and DNA flow cytometry analysis of staurosporine-induced apoptosis. *Cytometry* 36, 117-122.
- Green,MHL, Lowe,JE, Harcourt,SA, Akinluyi,P, Rowe,T, Cole,J, Anstey,AV, Arlett,CF (1992): UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and Xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique. *Mutation Res.* 273, 137-144.
- Grieco,MP, Hendricks,JD, Scanlan,RA, Sinnhuber,RO, Pierce,DA (1978): Carcinogenicity and acute toxicity of dimethylnitrosamine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 1127-1131.
- Grummt,T (2000): Coordination - Summary of the results. In: Forschungsverbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" 1995-1999. (Ed: Grummt,T) Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung, Außenstelle Dresden, Dresden, 200-213.
- Grummt,T (2000): Sachstand. In: Forschungsverbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" 1995-1999. (Ed: Grummt,T) Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung, Außenstelle Dresden, Dresden, 214-217.
- Gundert-Remy U. (2008): REACH aus der Sicht des Umwelt- und Verbraucherschutzes. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 51:1426-1433.
- Habashy,AP (1974): Age, growth, spawning and some biochemical data in the chub (*Leuciscus cephalus*, L.) in the Rouchovanka Creek. *Zoologické Listy* 23 (1), 71-83.
- Halver,JE (1967): Crystalline aflatoxin and other vectors for trout hepatoma. In: Trout Hepatoma Research Conference Papers. (Eds: Halver,JE, Mitchell,IA) US Government Printing Office, Washington, 78-102.
- Hantge,E (1992): Gentoxische Tests bei der Gewässer- und Einleiterüberwachung. *Wasser und Boden* 3, 118-123.
- Harbach,PR, Aaron,SK, Wiser,CR, Grygorczyk,CR, Smith,AL (1989): The *in vitro* unscheduled DNA synthesis (UDS) assay in rat primary hepatocytes. Validation of improved methods for primary culture including data on the lack of effect of ionizing radiation. *Mutation Res.* 216, 101-110.
- Harreus UA, Kleinsasser NH, Zieger S, Wallner B, Reiter M, Schuller P, Berghaus A. 2004. Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridization. *Mutation research* 563:131-138.
- Harshbarger,JC, Clark,JB (1990): Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. *Sci. Total Environ.* 94(1-2), 1-32.
- Hartmann,A, Elhajouji,A, Kiskinis,E, Poetter,F, Martus,H, Fjällman,A, Frieauff,W, Suter,W (2001): Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.* 39, 843-858.
- Hartmann,A, Fender,H, Speit,G (1998): Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the comet (single-cell gel) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 32, 17-24.
- Hartmann,A, Kiskinis,E, Fjällman,A, Suter,W (2001): Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutation Res.* 497, 199-212.
- Hartmann,A, Speit,G (1994): Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) Test. *Environ. Mol. Mutagen.* 23, 299-305.
- Hartmann,A, Speit,G (1995): Genotoxic effects of chemicals in the single cell (scg) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutation Res.* 346, 49-56.
- Hartmann,A, Speit,G (1997): The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters* 90, 183-188.
- Harvey,JS, Lyons,BP, Waldock,M, Parry,JM (1988): The application of the 32-P-postlabeling analysis of carcinogen-DNA adducts in mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 24, 317-320.

- Harvey,JS, Parry,JM (1998): The analysis of DNA adduct formation, removal and persistence in the common mussel *Mytilus edulis* exposed to 4-nitroquinoline 1-oxid. *Mutation Res.* 399, 31-42.
- Harvey,RG (1991): . In: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity. (Ed: Coombs,M) Cambridge University Press, Cambridge, UK, .
- Hasspieler,BM, Haffner,GD, Adeli,K (1996): Influence of DT diaphorase on quinone-mediated genotoxicity in human and fish cell lines. *Mutation Res.* 360, 43-49.
- Hasspieler,BM, Haffner,GD, Adeli,K (1997): Roles of DT diaphorase in the genotoxicity of nitroaromatic compounds in human and fish cell lines. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 52, 137-148.
- Hayes,MA, Smith,IR, Rushmore,TH, Crane,TL, Thorn,C, Kocal,TE, Ferguson,HW (1990): Pathogenesis of skin and liver neoplasms in white suckers from industrially polluted areas in Lake Ontario. *Sci. Total Environ.* 94(1-2), 105-123.
- Hellman,B, Vaghef,H, Boström,B (1995): The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Res.* 336, 123-131.
- Henderson,L, Wolfreys,A, Fedyk,J, Bourner,C, Windebank,S (1998): The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* 13, 89-94.
- Hendricks,JD, Meyers,TR, Shelton,DW, Casteel,JL, Bailey,GS (1985): Hepatocarcinogenicity of Benzo[a]pyrene to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. *J. Natl. Cancer Inst.* 74, 839-851.
- Hendricks,JD, Scanlan,RA, Williams,JL, Sinnhuber,RO, Grieco,MP (1980): Carcinogenicity of N-methyl-Ni-nitro-N-nitrosoguanidine to the livers and kidneys of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed as embryos. *J. Natl. Cancer Inst.* 64, 1511-1519.
- Hendricks,JD, Shelton,DW, Loveland,PM, Pereira,CB, Bailey,GS (1995): Carcinogenicity of dietary dimethylnitrosomorpholine, N-methyl-Ni-nitro-N-nitrosoguanidine, and dibromoethane in rainbow trout. *Toxicol. Pathol.* 23, 447-457.
- Hjertvik,M, Erixon,K, Ahnström,G (1998): Repair of DNA damage in mammalian cells after treatment with UV and dimethyl sulphate: discrimination between nucleotide and base excision repair by their temperature dependence. *Mutation Res.* 407, 87-96.
- Hoffmann,GR (1996): Chapter 9: Genetic Toxicology. In: Casarett and Doulls Toxicology: The Basic Science of Poisons. 5th ed. (Ed: Klaassen,CD) McGraw-Hill, New York, 269-300.
- Holliger,C, Gaspard,S, Glod,G, Heijman,C, Schumacher,W, Schwarzenbach,RP, Vazquez,F (1997): Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 517-523.
- Hollstein,MJ, McCann,J, Angelosanto,FA, Nichols,WW (1979): Short-term tests for carcinogens and mutagens. *J. Natl. Cancer Inst.* 65, 173-226.
- Holz,O, Jorres,A, Kastner,A, Krause,T, Magnussen,H (1995): Reproducibility of basal and induced DNA single strand breaks detected by the single cell gel electrophoresis assay in human peripheral mononuclear leukocytes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 67, 305-310.
- Howard,PC, Casciano,DA, Beland,FA, Shaddock,JG (1981): The binding of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to DNA and repair of the adducts in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis* 2, 97-102.
- Hubbard,SA, Green,MHL, Bridges,BA, Wain,AJ, Bridges,JW (1981): Fluctuation test with S9 and hepatocyte activation. In: Progress in Mutation Research. Vol. 1. (Eds: de Serres,FJ, Ashby,J) Elsevier, North-Holland, New York, .
- Hughes,CM, Lewis,SEM, McKelvey-Martin,VJ, Thompson,W (1997): Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Res.* 374, 261-268.
- Hughes,CM, McKelvey-Martin,VJ, Lewis,SEM (1999): Human Sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays. *Mutagenesis* 14, 71-75.
- ICCVAM - Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, NICEATM - National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation Of Alternative Toxicological Methods (1999): Evaluation of the Validation Status of Toxicological Methods: General Guidelines for Submissions to ICCVAM. NIH Publication No. 99-9946. ICCVAM - Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA.
- Ikegami,S, Taguchi,T, Ohashi,M, Oguro,M, Naguno,U, Mano,Y (1978): Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha. *Nature* 275, 458-460.
- Ikenaga,M, Takebe,H (1981): Actions of 4-Nitroquinoline 1-Oxide on Eukaryotic Cells: Molecular and Cellular Studies. In: The Nitroquinolines. Vol. 6. (Ed: Sugimura,T) Raven Press, New York, 65-92.
- Ikenaga,M, Takebe,H, Ishii,Y (1977): Excision repair of DNA base damage in human cells treated with the chemical carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutation Res.* 43, 415-427.

- Inga,A, Iannone,R, Degan,P, Campomenosi,P, Fronza,G, Abbondandolo,A, Menichini,P (1994): Analysis of 4-nitroquinoline-1-oxide induced mutations at the hprt locus in mammalian cells: possible involvement of preferential DNA repair. *Mutagenesis* 9, 67-72.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1974): N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Some aromatic amines, hydrazine and related substances, N-Nitroso compounds and miscellaneous alkylating agents. Vol. 4. (:) World Health Organization/International Agency for Research on Cancer, Lyon, 183.
- Johnson,FM (1998): The genetic effects of environmental lead. *Mutation Res.* 410, 123-140.
- Kalberlah F, Bunke D, Augustin R, Oppl R. (2011): Karzinogene, mutagene, reproduktionstoxische (CMR) und andere problematische Stoffe in Produkten - Identifikation relevanter Stoffe und Erzeugnisse, Überprüfung durch Messungen, Regelungsbedarf im Chemikalienrecht. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.
- Kamer,I, Rinkevich,B (2002): *In vitro* application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line. *Toxic. in vitro* 16, 177-184.
- Kammann,U, Bunke,M, Steinhart,H, Theobald,N (2001): A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Res.* 498, 67-77.
- Kanter,PM, Schwartz,HS (1982): A fluorescence enhancement assay for cellular DNA damage. *Molecular Pharmacology* 22, 145-151.
- Kawazoe,Y (1981): Chemistry of 4-Nitroquinoline 1-Oxide and Related Compounds. In: The Nitroquinolines. Vol. 6. (Ed: Sugimura,T) Raven Press, New York, 1-24.
- Kelly,JJ, Maddock,MB (1985): *In vitro* induction of unscheduled DNA synthesis by genotoxic carcinogens in the hepatocytes of the oyster toadfish (*Opsanus tau*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 555-563.
- Kennedy,CJ, Gill,KA, Walsh,PJ (1991): In-vitro metabolism of benzo(a)pyrene in the blood of the gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Mar. Environ. Res.* 31, 37-53.
- Kent,CRH, Eady,JJ, Ross,GM, Steel,GG (1995): The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. *Int. J. Radiat. Biol.* 67, 655-660.
- Kiskinis,E, Suter,W, Hartmann,A (2002): High throughput Comet assay using 96-well plates. *Mutagenesis* 17, 37-43.
- Kizilian,N, Wilkins,RC, Reinhardt,P, Ferrarotto,C, McLean,JR, McNamee,JP (1999): Silver-stained comet assay for detection of apoptosis. *Biotechniques* 27, 926-930.
- Klaude,M, Eriksson,S, Nygren,J, Ahnström,G (1996): The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Res.* 363, 89-96.
- Kocan,RM, Sabo,KM, Landoldt,ML (1985): Cytotoxicity/Genotoxicity: The application of cell culture techniques to the measurement of marine sediment pollution. *Aquat. Toxicol.* 6, 165-177.
- Kriek,E, Westra,JG (1979): Metabolic activation of aromatic amines and amides and interactions with nucleic acids. In: Chemical Carcinogens and DNA. Vol. 2. (Ed: Grover,PL) CRC Press, Boca Raton, 1-28.
- Kuchenmeister,F, Schmezer,P, Engelhardt,G (1998): Genotoxic bifunctional aldehydes produce specific images in the comet assay. *Mutation Res.* 419, 69-78.
- Kurelec,B, Gupta,RC (1993): Biomonitoring of aquatic systems. In: Postlabeling Methods for the Detection of DNA Adducts. (Eds: Phillips,DH, Castegarno,M, Bartsch,H) IARC, Lyon, 365-372.
- Lankinen,MH, Vilpo,LM, Vilpo,JA (1996): UV- and gamma-irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutation Res.* 352, 31-38.
- Large,AT, Shaw,JP, Peters,LD, McIntosh,AD, Webster,L, Mally,A, Chipman,JK (2002): Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 54, 493-497.
- Latt,SA, Allen,J, Bloom,SE, Carrano,A, Falke,E, Kram,D, Schneider,E, Schreck,R, Tice,R, Whitfield,B, Wolff,S (1981): Sister-chromatid exchanges: a report of the gene-tox program. *Mutation Res.* 87, 17-62.
- Le Curieux,F, Marzin,D, Erb,F (1993): Comparison of three short-term assays: results on seven chemicals. Potential contribution to the control of water genotoxicity. *Mutation Res.* 319, 223-236.
- Lee,LEJ, Clemons,JH, Bechtel,DG, Caldwell,SJ, Han,KB, Pasitschniak-Arts,M, Mosser,DD, Bols,NC (1993): Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biology and Toxicology* 9, 279-294.
- Legault,R, Blaise,C, Rokosh,D, Chong-Kit,R (1994). Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal 9, 45-59.
- Lehninger,AL, Nelson,DL, Cox,MM (1998): Prinzipien der Biochemie. 2nd ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Leroy,T, Van Hummelen,P, Anard,D, Castelain,P, Kirsch-Volders,M, Lauwerys,R, Lison,D (1996): Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: Alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 47, 409-422.

- Lewis,RJ (1991): Carcinogenically active chemicals: A reference guide. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Liepelt,A, Karbe,L, Westendorf,J (1995): Induction of DNA strand breaks in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under hypoxic and hyperoxic conditions. *Aquat. Toxicol.* 33, 177-181.
- Ljungberg,O (1976): Epizootiological and experimental studies of skin tumours in northern pike (*Esox lucius* L.) in the Baltic Sea. *Prog. Exp. Tumor Res.* 20, 156-165.
- Lourenco J, Pereira R, Goncalves F, Mendo S. (2012): Metal bioaccumulation, genotoxicity and gene expression in the European wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) inhabiting an abandoned uranium mining area. *The Science of the total environment* 443C:673-680.
- Lund,E, Galanti,MR (1999): Incidence of thyroid cancer in Scandinavia following fallout from atomic bomb testing: an analysis of birth cohorts. *Cancer Causes Control.* 10, 181-187.
- Madle,S, Lang,R (1993): Beurteilung und Bewertung von Genotoxizitätsbefunden. In: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie.* (Ed: Fahrig,R) Wiss. Buchgesellschaft, Darmstadt, 354-361.
- Malins,DC, Krahn,MM, Myers,MS, Rhodes,LD, Brown,DW, Krone,CA, McCain,BB, Chan,S (1985): Toxic chemicals in sediments and biota from a creosote-polluted harbor: Relationships with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*). *Carcinogenesis* 6, 1463.
- Malins,DC, McCain,BB, Brown,DW, Chan,SL, Meyers,MS, Landhal,JT, Prohaska,PG, Friedman,AJ, Rhodes,LD, Burrows,DG, Gronlund,WD, Hodgins,HO (1984): Chemical pollutants in sediments and diseases of bottom-dwelling fish in Puget Sound, Washington. *Environmental Science and Technology* 18, 705-713.
- Malins,DC, McCain,BB, Brown,DW, Varanasi,U, Krahn,MM, Myers,MS, Chan,SL (1987): Sediment-associated contaminants and liver diseases in bottom-dwelling fish. *Hydrobiologia* 149, 67-74.
- Malmström,CM, Miettinen,S, Bylund,G (2000): DNA adducts in liver and leukocytes of flounder (*Platichthys flesus*) experimentally exposed to benzo(a)pyrene. *Aquat. Toxicol.* 48, 177-184.
- Maron,DM, Ames,BN (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* 113, 173-215.
- Masfaraud,JF, Devaux,A, Pfohl-Leszkowicz,A, Malaveille,C, Monod,G (1992): DNA adduct formation and 7-ethoxyresorufin O-deethylase induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to Benzo[a]pyrene. *Toxic. in vitro* 6, 523-531.
- Matsuoka,A, Yamazaki,N, Suzuki,T, Hayashi,M, Sofuni,T (1993): Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional *in vitro* chromosomal aberration test. *Mutation Res.* 272, 223-236.
- McCann,J, Choi,E, Yamasaki,E, Ames,BN (1975): Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 5135-5139.
- McKelvey-Martin,VJ, Green,MHL, Schmeizer,P, Pool-Zobel,BL, De Meo,MP, Collins,A (1993): The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Res.* 288, 47-63.
- McNamee,JP, McLean,JRN, Ferrarotto,CL, Bellier,PV (2000): Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Res.* 466, 63-69.
- Means,JC, Daniels,CB (1988): Development of *in vivo* genotoxicity tests in estuarine fish and their application to aquatic toxicology. *Mar. Environ. Res.* 24, 327-331.
- Meintieres,S, Nesslany,F, Pallardy,M, Marzin,D (2003): Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. *Environ. Mol. Mutagen.* 41, 260-269.
- Menichini,P, Fronza,G, Tornaletti,G, Galiègue-Zouitina,S, Bailleul,B, Loucheux-Lefebvre,MH, Abbondandolo,A, Perdrini,AM (1989): *In vitro* DNA modification by the ultimate carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide: influence of superhelicity. *Carcinogenesis* 10, 1593-1598.
- Miadokova,E, Vlckova,V, Podstavkova,S, Slaninova,M, Vlcek,D (1998): Unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an activation system for 2-aminofluorene. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 383-389.
- Micic,M, Bihari,N, Jaksic,Z, Müller,WE, Batel,R (2002): DNA damage and apoptosis in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 53, 243-262.
- Mikaelian,I, de Lafontaine,Y, Harshbarger,JC, Lee,LL, Martineau,D (2002): Health of lake whitefish (*Coregonus chupeaformis*) with elevated tissue levels of environmental contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(3), 532-541.
- Miller,B, Albertini,S, Locher,F, Thybaud,V, Lorge,E (1997): Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Res.* 392, 45-59.
- Miltenburger,HG (1993): Die Durchführung von Genotoxizitätstests. Der Einfluss der Zytotoxizität auf das Testergebnis. In: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie.* (Ed: Fahrig,R) Wiss. Buchges. Darmstadt, Darmstadt, 162-168.
- Mitchelmore,CL, Chipman,JK (1998a): Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquat. Toxicol.* 41, 161-182.
- Mitchelmore,CL, Chipman,JK (1998b): DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Res.* 399, 135-147.

- Miyamae,Y, Iwasaki,K, Kinae,N, Tsuda,S, Murakami,M, Tanaka,M, Sasaki,YF (1997): Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutation Res.* 393, 107-113.
- Montheit,DK, Ding,D, Chen,YT, Michalopoulos,G, Strom,SC (1990): Induction of cytochrome P450 mRNA and benzo(a)pyrene metabolism in primary human hepatocyte cultures with benzantracene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 105, 460-471.
- Moore,MJ, Myers,MS (1994): Pathobiology of chemical-associated neoplasia in fish. In: *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. (Eds: Malins,DC, Ostrander,GK) CRC Press, Boca Raton, FL, 327-386.
- Moretti,M, Villarini,M, Scasselati-Sforzolini,G, Santroni,AM, Fedeli,D, Falcioni,G (1998): Extent of DNA damage in density-separated trout erythrocytes assessed by the "comet" assay. *Mutation Res.* 397, 353-360.
- Mortelmans,K, Zeiger,E (2000): The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Res.* 455, 29-60.
- Mount,DI (1989): Methods for aquatic toxicity identification evaluation. Phase III. Toxicity confirmation procedures. U.S. Environmental Protection Agency. EPA/600/3-88/036, Washington DC.
- Mount,DI, Anderson-Carnahan,L (1989): Methods for aquatic toxicity identification evaluation. Phase II. Toxicity identification procedures. U.S. Environmental Protection Agency. EPA/600/3-88/035, Washington DC.
- Müller N. (2011): GHS - das neue Chemikalienrecht : vergleichende Gegenüberstellung mit Kommentar, 3. Aufl. ed. Ecomed Sicherheit, Landsberg/Lech.
- Mullenders,LHF (1998): Transcription response and nucleotide excision repair. *Mutation Res.* 409, 59-64.
- Murchelano,RA, Wolke,RE (1991): Neoplasms and nonneoplastic liver lesions in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts. *Environ. Health Perspect.* 90, 17-26.
- Myers,MS, Landahl,JT, Krahn,MM, Johnson,LL, McCain,BB (1990): Overview of studies on liver carcinogenesis in English Sole from Puget Sound; evidence for a xenobiotic chemical etiology: I. Pathology and epizootiology. *Sci. Total Environ.* 94, 33-50.
- Myers,MS, Stehr,CM, Olsen,OP, Johnson,LL, McCain,BB, Chan,SL, Varanasi,U (1994): Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus linatus*) from selected marine sites on the Pacific Coast, USA. *Environ. Health Perspect.* 102, 200-215.
- Nacci,DE, Cayula,S, Jackim,E (1996): Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.* 35, 197-210.
- Nacci,DE, Cayula,S, Jackim,E (1996): Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.* 35, 197-210.
- Nagao,M, Sugimura,T (1976): Molecular biology of the Carcinogen, 4-Nitroquinoline 1-oxide. In: *Advances in Cancer Research*. Vol. 23. (Ed: Klein,G) Academic Press, New York, San Francisco, London, 131-169.
- Nehls,S, Segner,H (1999): Abschlussbericht zum Teilprojekt 7: Weiterentwicklung, Anpassung und Beurteilung der Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) an Primärzellen und permanenten Zelllinien von Fischen zum Nachweis gentoxischer Potentiale in Oberflächenwasser - *in vitro* Screening. Verbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächengewässer". Förderkennzeichen 02-WU 9555/7.
- Nehls,S, Segner,H (2001): Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay. *Environ. Toxicol.* 16, 321-329.
- Nehls, S., Segner, H. (2005): Comet assay with the fish cell line Rainbow Trout Gonad-2 for *in vitro* genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (8), 2078-2087
- Newman,Michael C (1995): Quantitative methods in aquatic ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Niess,AM, Hartmann,A, Grünert-Fuchs,M, Poch,B, Speit,G (1996): DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int. J. Sports Med.* 17, 397-403.
- Nigro,M, Frenzilli,G, Scarcelli,V, Gorbi,S, Regoli,F (2002): Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Mar. Environ. Res.* 54, 517-520.
- Norberg-King,TJ, Mount,DI, Durhan,EJ, Ankley,GT, Burkhard,LP, Amato,JR, Lukasewycz,MT, Schubauer-Berigan,MK, Anderson-Carnahan,L (1991): Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase I. Toxicity characterization procedures. 2nd ed. U.S. Environmental Protection Agency. EPA/600/6-91/003, Washington DC.
- Nöthel,H (1993): Ökologische Genetik. In: *Handbuch zur Ökologie*. Mit Beiträgen zahlreicher Fachgelehrter. (Ed: Kuttler,W) Analytica Verlagsges., Berlin, .
- OECD (2013 und vorangehende Jahre): OECD Guidelines for Testing of Chemicals. URL: <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm> . Zugriff am 12.01.2013. OECD, Paris, Frankreich.
- Olive,PL, Banath,JP, Durand,RE (1990): Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.* 122, 86-94.

- Olive, PL, Banath, JP (1993): Induction and rejoining of radiation-induced DNA single strand breaks: 'tail moment' as a function of position in the cell cycle. J. Natl. Cancer Inst. 294, 275-283.
- Olive, PL, Banath, JP, Durand, RE (1997): Detection of subpopulations resistant to DNA-damaging agents in spheroids and murine tumours. Mutation Res. 375, 157-165.
- Olive, PL, Durand, RE, Wlodek, D, Banath, JP (1992): Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. Exp. Cell Res. 198, 259-267.
- Olive, PL, Frazer, G, Banath, JP (1993): Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. Radiat. Res. 136, 130-136.
- Östling, O, Johanson, KJ (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 123, 291-298.
- Östling, O, Johanson, KJ (1987): Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. Int. J. Radiat. Biol. 52, 683-691.
- Osman AG, Abuel-Fadl KY, Kloas W. (2012): In situ evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: II. Detection of DNA strand-breakage and apoptosis in *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Mutation research 747:14-21.
- Osman AGM, Abd El Reheem A-E-BM, Moustafa MA, Mahmoud UM, Abuel-Fadl KY, Kloas W. (2011): In situ evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: I. Micronucleus and nuclear lesion tests of erythrocytes of *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Toxicological & Environmental Chemistry 93:1002-1017.
- Pacheco, M, Santos, MA (1997): Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety 38, 252-259.
- Pandurangi, R, Petras, M, Ralph, S, Vrzoc, M (1995): Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. Environmental and Molecular Mutagenesis 26, 345-356.
- Parkinson, A (1996): Biotransformation of Xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 5th ed. (Ed: Klaassen, CD) McGraw-Hill, New York, 269-300.
- Parlar, H, Angerhöfer, D (1991): Chemische Ökotoxikologie. Springer-Verlag, .
- Paterson, RR, Kelley, J, Gallagher, M (1997): Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* (Link) in water. Lett. Appl. Microbiol. 25, 435-436.
- Peakall, D (1992): Animal Biomarkers as Pollution Indicators. Chapman and Hall, London.
- Penning, TM, Burczynski, ME, Hung, CF, McDoull, KD, Palackal, NT, Tsuruda, LS (1999): Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. Chem. Res. Toxicol. 12, 1-18.
- Philippart, JC (1972): ? Estimation de l' age et de la Croissance de la Chevaine, *Leuciscus cephalus* au moyen des écailles? Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique Tome 102, Fascicule 1-2, 48-81.
- Philips, DH (1983): Fifty Years of Benzo[a]pyrene. Nature 303, 468-472.
- Pierce, KV, McCain, BB, Wellings, SR (1978): Pathology of hepatomas and other liver abnormalities in English sole (*Parophrys vetulus*) from the Duwamish River estuary, Seattle, Washington. J. Natl. Cancer Inst. 60(6), 1445-1453.
- Pietrapiana, D, Modena, M, Guidetti, P, Falugi, C, Vacchi, M (2002): Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in the Ligurian Sea (NW-Mediterranean). Marine Pollution Bulletin 44(3), 238-243.
- Pinkney, AE, Harshbarger, JC, May, EB, Melancon, MJ (2001): Tumor prevalence and biomarkers of exposure in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from the tidal Potomac River, USA, watershed. Environmental Toxicology and Chemistry 20(6), 1196-1205.
- Plappert, U, Barthel, E, Raddatz, K, Seidel, HJ (1994): Early effects of benzene exposure in mice. Hematological versus genotoxic effects. Arch. Toxicol 68, 284-290.
- Ploch, SA, King, LC, Di Giulio, RT (1998): Comparative time-course of benzo(a)pyrene-DNA adduct formation, and its relationship to CYP1A activity in two species of catfish. Mar. Environ. Res. 46, 345-349.
- Poirier, MC, Fullerton, NF, Kinouchi, T, Smith, BA, Beland, FA (1991): Comparison between DNA adduct formation and tumorigenesis in livers and bladders of mice chronically fed 2-acetylaminofluorene. Carcinogenesis 12, 895-900.
- Pollenz, RS, Necela, B (1998): Characterization of two continuous cell lines derived from *Oncorhynchus mykiss* for models of aryl-hydrocarbon-receptor-mediated signal transduction. Direct comparison to the mammalian Hepa-1c1c7 cell line. Aquatic Toxicology 41, 31-49.
- Pool-Zobel, BL (1993): Kapitel 16: Bedeutung von Indikatortests an nichtproliferierenden Säugerzellen für die Gentoxizitätsprüfung. In: Mutationsforschung und genetische Toxikologie. (Ed: Fahrig, R) Wissenschaftliche Buchgesellschaft Darmstadt, Darmstadt, 186-188.

- Pool-Zobel,BL, Guidas,C, Klein,R, Neudecker,C, Renner,HW, Schmezer,P (1993): Assessment of genotoxic effects by lindane. *Fd Chem. Toxic.* 31, 271-283.
- Quillardet,P, Huisman,O, D'Ari,R, Hofnung,M (1982): SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5971-5975.
- Quillardet,P, Huisman,O, D'Ari,R, Hofnung,M (1982): SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5971-5975.
- Rand,Gary M (Ed.) (1995): *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. 2nd ed. Taylor & Francis, Washington.
- Randerath,K, Randerath,E, Danna,TF, van Golen,KL, Putman,KL (1989): A new sensitive 32P-postlabeling assay based on the specific enzymatic conversion of bulky DNA lesions to radiolabeled dinucleotides and nucleoside 5'-monophosphates. *Carcinogenesis* 10, 1231.
- Randerath,K, Reddy,MV, Gupta,RC (1981): 32P-labeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6126.
- Rao,SS, Neheli,T, Carey,JH, Cairns,VW (1997): Fish hepatic micronuclei as an indication of exposure to genotoxic environmental contaminants. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal* 12, 217-222.
- Rauth,AM, Goldberg,Z, Misra,V (1997): DT-diaphorase: Possible roles in cancer chemotherapy and carcinogenesis. *Oncology Research* 9, 339-349.
- Reichert,WL, Myers,MS, Peck-Miller,K, French,B, Anulacion,BF, Collier,TK, Stein,JE, Varanasi,U (1998): Molecular epizootiology of genotoxic events in marine fish: Linking contaminant exposure, DNA damage, and tissue-level alterations. *Mutation Res.* 411, 215-225.
- Reifferscheid,G, Heil,J, Oda,Y, Zahn,RK (1991): A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutation Res.* 253, 215-222.
- Reifferscheid,G, Heil,J, Zahn,RK (1991): Die Erfassung von Gentoxinen in Wasserproben mit dem umu-Mikrotest. *Vom Wasser* 76, 153-166.
- Reifferscheid,G, Zipperle,J (2000): Entwicklung und Erprobung luminometrischer und fluorometrischer umu-Testverfahren zur Untersuchung gentoxischer Substanzen in Oberflächenwasser. In: Forschungsverbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" 1995-1999. (Ed: Grummt,T) Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung, Außenstelle Dresden, Dresden, 140-164.
- Rickert,Jens (1996): Untersuchungen zur Erfassung von Gentoxizität in Wasserproben mit Säuger- und Fischzelllinien. Dissertation Thesis, FB Biologie der Techn. Hochschule Darmstadt. 141 p.
- Robbiano,L, Carrozzino,R, Puglia,CP, Corbu,C, Brambilla,G (1999): Correlation between induction of DNA fragmentation and micronuclei formation in kidney cells from rats and humans and tissue-specific carcinogenic activity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 161, 153-159.
- Roti Roti,JL, Wright,WD (1987): Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage and repair. *Cytometry* 8, 461-467.
- Rubes,J, Kucharova,S, Vozdova,M, Musilova,P, Zudova,Z (1998): Cytogenetic analysis of peripheral lymphocytes in medical personnel by means of FISH. *Mutation Res.* 412, 293-298.
- Rundell,MS, Wagner,ED, Plewa,MJ (2003): The comet assay: Genotoxic damage or nuclear fragmentation? *Environ. Mol. Mutagen.* 42, 61-67.
- Rydberg,B, Johanson,KJ (1978): Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: *DNA Repair Mechanisms*. (Eds: Hanawalt,PC, Friedberg,EC, Fox,CF) Academic Press, New York, 465-468.
- Sacher,F, Lenz,S, Brauch,HJ, Hamsch,B (2000): Weiterentwicklung chemisch-analytischer Verfahren zur Erfassung gentoxischer Substanzen in Wässern. In: Forschungsverbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" 1995-1999. (Ed: Grummt,T) Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung, Außenstelle Dresden, Dresden, 180-199.
- Sachs,L (1984): *Angewandte Statistik*. 6th ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Sambrook,J, Fritsch,EF, Maniatis,T (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, .
- Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT. (1997): Fluorescence in situ hybridization with Comets. *Exp Cell Res* 232:407-411.
- Sargent,S, Roloff,B, Meisner,L (1989): *In vitro* chromosome damage due to PCB interactions. *Mutation Res.* 224, 79-88.
- Sasaki,YF et al. (2000): The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Crit. Rev. Toxicol.* 30 (6), 629-799.

- Sasaki,YF, Izumiyama,F, Nishidate,E, Ishibashi,E, Ishibashi,S, Tsuda,S, Matsusaka,N, Asano,N, Saotome,K, Sofuni,T, Hayashi,M (1997): Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. *Mutation Res.* 393, 133-139.
- Sauvaigo,S, Serres,C, Signorini,N, Emonet,N, Richard,MJ, Cadet,J (1998): Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Analytical Biochemistry* 259, 1-7.
- Schmid (1975): The micronucleus test. *Mutation Res.* 31, 9-15.
- Sealy,PG, Southern,EM (1990): Chapter 2: Gel Electrophoresis of DNA. In: *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids*. (Eds: Rickwood, Hames) IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, 51-99.
- Shugart,L (1995): Environmental genotoxicology. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. (Ed: Rand,GM) Taylor & Francis, Washington, 405-419.
- Shugart,LR (1988): Quantification of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by the alkaline unwinding assay. *Aquat. Toxicol.* 13, 43-52.
- Sikka,HC, Steward,AR, Elmarakby,SA, Kumar,S, Devanaboyina,U, Gupta,RC (1995): Metabolism of 2-Acetylaminofluorene by rainbow trout. *Mar. Environ. Res.* 39, 45-49.
- Singh,NP (2000): Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Res.* 455 (Special Issue, Protocols in Mutagenesis), 119-135.
- Singh,NP, Danner,DB, Tice,RR, Brant,L, Schneider,EL (1990): DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutation Res.* 237, 123-130.
- Singh,NP, McCoy,MT, Tice,RR, Schneider,EL (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Singh,NP, Stephens,RE (1997): Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutation Res.* 383, 167-175.
- Singh,NP, Stephens,RE, Singh,H, Lai,H (1999): Visual quantification of DNA double-strand breaks in bacteria. *Mutation Res.* 429, 159-168.
- Singh,NP, Tice,RR, Stephens,RE, Schneider,EL (1991): A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Res.* 252, 289-296.
- Slamenova,D, Gabelova,A, Ruzekova,L, Chalupa,I, Horvatova,E, Farkasova,T, Bozsakyova,E, Stetina,R (1997): Detection of MMNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations. *Mutation Res.* 383, 243-252.
- Smeets,JMW, Voormolen,A, Tillit,DE, Everaarts,JM, Seinen,W, van den Berg,M (1999): Cytochrome P450A induction, benzo(a)pyrene metabolism, and nucleotide adduct formation in fish hepatoma cells: effect of preexposure to 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 474-480.
- Smith,CE, Peck,TH, Klauda,RJ, McLaren,JB (1979): Hepatomas in Atlantic tomcod *Microgadus tomcod* (Walbaum) collected in the Hudson River estuary in New York. *J. Fish Diseases* 2, 313-319.
- Smith,SL, MacDonald,DD, Keenleyside,KA, Gaudet,CL (1996): The development and implementation of Canadian sediment quality guidelines. In: *Development and Progress in Sediment Quality Assessment: Rationale, Challenges, Techniques and Strategies*. (Eds: Munawar,M, Dave,G) Academic Publishing, Amsterdam, 233-249.
- Smolarek,TA, Morgan,SL, Moynihan,CG, Lee,H, Harvey,RG, Baird,WM (1987): Metabolism and DNA adduct formation of Benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in fish cell lines in culture. *Carcinogenesis* 8, 1501-1508.
- Sokal,RR, Rohlf,FJ (1995): *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3rd ed. W.H. Freeman & Co., New York.
- Somorovska,M, Szabova,E, Vodicka,P, Tulinska,J, Barancokova,M, Fabry,R, Liskova,A, Riegerova,Z, Petrovska,H, Kubova,J, Rausova,K, Dusinska,M, Collins,A (1999): Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the Comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutation Res.* 445, 181-192.
- Sorensen,EM (1991): *Metal poisoning in fish*. CRC Press, Inc., Florida. 374 pages.
- Speit,G, Hartmann,A (1995): The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10, 555-559.
- Speit,G, Trenz,K, Schutz,P, Rothfuss,A, Merk,O (1999): The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicology Letters* 110, 73-78.
- Stang A, Brendamour M, Schunck C, Witte I. (2010): Automated analysis of DNA damage in the high-throughput version of the comet assay. *Mutation research* 698:1-5.
- Stang A, Witte I. (2009): Performance of the comet assay in a high-throughput version. *Mutation research* 675:5-10.

- Stegeman, JJ (1981): Polynuclear aromatic hydrocarbons and their metabolism in the marine environment. In: Polycyclic Hydrocarbons and Cancer. Vol. 3. (Eds: Gelboin, HV, T'so, POP) Academic Press, New York, 1-60.
- Steinert, SA (1996): Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. Mar. Environ. Res. 42, 253-259.
- Stich, HF, Acton, AB, Dunn, BP, Oishi, K, Yamazaki, F, Harada, T, Peters, G, Peters, N (1977): Geographic variations in tumor prevalence among marine fish populations. Int. J. Cancer 20(5), 780-791.
- Sugimura, T (Ed.) (1981): The Nitroquinolines. Vol. 6. Raven Press, New York.
- Sugimura, T, Okabe, K, Nagao, M (1966): The metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide to 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rat liver and hepatomas. Cancer Res. 26, 1717-1721.
- Sutherland, JC, Chen, CZ, Emrick, A, Hacham, H, Monteleone, DC, Ribeiro, E, Trunk, J, Sutherland, BM (1990): Lesion measurement in non-radioactive DNA by quantitative gel electrophoresis. In: DNA Damage and Repair in Human Tissues. (Eds: Sutherland, BM, Woodhead, AD) Plenum Press, New York, 45-61.
- Swieringa, SHH, Bradlaw, JA, Brillinger, RL, Gilman, JPW, Nestmann, ER, San, RC (1991): Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: I. Unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocyte cultures. Mutation Res. 246, 235-253.
- Tada, M (1981): Metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide and related compounds. In: The Nitroquinolines. Vol. 6. (Ed: Sugimura, T) Raven Press, New York, 25-45.
- Tennant, RW, Margolin, BH, Shelby, MD, Zeiger, E, Haseman, JK, Spalding, J, Caspary, W, Resnick, M, Stasiewicz, S, Anderson, B, et al. (1987): Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from *in vitro* genetic toxicity assays. Science 236, 933-941.
- Theodorakis, CW, D'Surney, SJ, Shugart, LR (1994): Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis. Environmental Toxicology and Chemistry 13, 1023-1031.
- Theodorakis, CW, Elbl, T, Shugart, LR (1999): Genetic ecotoxicology IV: survival and DNA strand breakage is dependent on genotype in radionuclide-exposed mosquitofish. Aquat. Toxicol. 45, 279-291.
- Thornton, SC, Diamond, L, Baird, WM (1982): Metabolism of Benzo[a]pyrene by fish cells in culture. Journal of Toxicology and Environmental Health 10, 157-167.
- Tice, RR (1995): Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: Biomonomitors and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. (Eds: Butterworth, FM, Corkum, LD, Guzman-Rincon, J) Plenum Press, New York, 69-79.
- Tice, RR, Agurell, E, Anderson, D, Burlinson, B, Hartmann, A, Kobayashi, H, Miyamae, Y, Rojas, E, Ryu, JC, Sasaki, YF (2000): Single cell gel/Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35, 206-221.
- Tice, RR, Strauss, GHS, Peters, WPP (1992): High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: Preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. Mutation Res. 271, 101-113.
- United States Department of Health and Human Services (1982): The Health Consequences of Smoking: Cancer. A report of the Surgeon General, Office on Smoking and Health. United States Department of Health and Human Services, Rockville, MD.
- Vahl, HH, Karbe, L, Westendorf, J (1997): Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river: Comparison of *Salmonella* microsome test, arabinose resistance test, and umu-test. Mutation Res. 394, 81-93.
- Vahl, HH, Karbe, L, Westendorf, J (1997): Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river: Comparison of *Salmonella* microsome test, arabinose resistance test, and umu-test. Mutation Res. 394, 81-93.
- Van Goethem, F, Lison, D, Kirsch-Volders, M (1997): Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. Mutation Res. 392, 31-43.
- Varanasi, U, Reichert, WL, Le Eberhard, BT, Stein, JE (1989): Formation and persistence of Benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*). Chem.-Biol. Interactions 69, 203-216.
- Varanasi, U, Reichert, WL, Stein, JE (1989): 32P-postlabeling analysis of DNA adducts in liver of wild English Sole (*Parophrys vetulus*) and Winter Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Cancer Res. 49, 1171-1177.
- Verschaeve, L, Gilles, J (1995): Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 54, 112-119.
- Vijayalaxmi, Tice, RR, Strauss, GHS (1992): Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. Mutation Res. 271, 243-252.

- Villarini,M, Moretti,M, Damiani,E, Greci,L, Santroni,AM, Fedeli,D, Falcioni,G (1998): Detection of DNA damage in stressed trout nucleated erythrocytes using the comet assay: protection by nitroxide radicals. *Free Radical Biology and Medicine* 24, 1310-1315.
- Vrzoc,M, Petras,ML (1997): Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutation Res.* 381, 31-40.
- Vuillaume,M (1987): Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutation Res.* 186, 43-72.
- Wada,S, Van Khoa,T, Kobayashi,Y, Funayama,T, Yamamoto,K, Natsuhori,M, Ito,N (2003): Detection of radiation-induced apoptosis using the comet assay. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 1161-1166.
- Wagner K, Fach B, Kolar R. (2012): Inconsistencies in data requirements of EU legislation involving tests on animals. *Altex* 29:302-332.
- Waldmann,P, Kramer,M, Metz,I, Mauer,M, Hübner,I (2000): The alkaline elution with the clam *Corbicula fluminea*: a rapid and sensitive method for the detection of genotoxic potentials in native surface waters - data of two laboratories. In: Forschungsverbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächenwasser" 1995-1999. (Ed: Grummt,T) Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung, Außenstelle Dresden, Dresden, 31-51.
- Walton,DG, Acton,AB, Stich,HF (1983): DNA repair synthesis in cultured mammalian and fish cells following exposure to chemical mutagens. *Mutation Res.* 124, 153-161.
- Walum,E, Stenberg,K, Jenssen,D (1990): Chapter 9: Cell Genotoxicity. In: *Understanding Cell Toxicology. Principles and Practice.* (:) Ellis Horwood, New York, 181-201.
- Welzbacher,U (1998): Das neue Chemikalienrecht. Praktische Anleitung und Stoffinformation zur Umsetzung der erforderlichen Arbeitsschutzmaßnahmen. WEKA Fachverlag f. technische Führungskräfte GmbH, Augsburg.
- Welzbacher U. 2007. Chemikalienrecht verstehen und umsetzen : inkl. Gefahrstoffdatenbank, Stand: 6/2007 ff ed. WEKA Media, Kissing.
- White,PA, Rasmussen,JB (1998): The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Res.* 410, 223-236.
- White,PA, Rasmussen,JB, Blaise,C (1996): Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 27, 116-139.
- Wilkins,RC, Wilkinson,D, Maharaj,HP, Bellier,PV, Cybulski,MB, McLean,JRN (2002): Differential apoptotic response to ionizing radiation in subpopulations of human white blood cells. *Mutation Res.* 513, 27-36.
- Will,O, Schindler,D, Boiteux,S, Epe,B (1998): Fanconi's anaemia cells have normal steady-state levels and repair of oxidative DNA base modifications sensitive to Fpg protein. *Mutation Res.* 409, 65-72.
- Williams,DE (2012): The rainbow trout liver cancer model: Response to environmental chemicals and studies on promotion and chemoprevention. *Comp. Biochem. Phys. C* 155(1), 121-127.
- Williams,GT (1991): Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65, 1097-1098.
- Wilson,JT, Pascoe,PL, Parry,JM, Dixon,DR (1998): Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Res.* 399, 87-95.
- Wirgin,I, Waldman,JA (1998): Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. *Mutation Res.* 399, 193-219.
- Wolf,K, Quimby,MC (1962): Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science* 135, 1065-1066.
- Wyllie,AH (1992): Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: An overview. *Cancer Metast. Rev.* 11, 95-103.
- Yalkowsky,SH, Dannenfelser,RM (1990): AQUASOL database of aqueous solubility. 5th ed. University of Arizona, Tucson (AZ, USA).
- Yamasaki,HP, Pulkrabek,P, Grunberger,D, Weinstein,IB (1977): Differential excision from DNA of the C-8 and N2 guanosine adducts of N-acetyl-2-aminofluorene by single strand-specific endonucleases. *Cancer Res.* 37, 3756-3760.
- Yano,T, Takahashi,S, Ichikawa,T (1995): Active oxygen generated in the process of carcinogen metabolism can induce oxidative damage in the nuclei. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 87, 367-370.
- Yasuhara,S, Zhu,Y, Matsui,T, Tipirneni,N, Yasuhara,Y, Kaneki,M, Rosenzweig,A, Martyn,IAJ (2003): Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 51, 873-885.
- Yendle,JE, Tinwell,H, Elliott,BM, Ashby,J (1997): The genetic toxicity of time: Importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. *Mutation Res.* 375, 125-136.
- Zabel,EW, Pollenz,R, Peterson,RE (1996): Relative potencies of individual polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners and congener mixtures based on induction of cytochrome P4501A

- mRNA in a rainbow trout gonadal cell line (RTG-2). *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 2310-2318.
- Zeiger,E, Haseman,JK, Shelby,MD, Margolin,BH, Tennant,RW (1990): Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 16 Suppl 18, 1-14.
- Zhivotovsky,B, Joseph,B, Orrenius,S (1999): Tumor radiosensitivity and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 248, 10-17.

Anhang 1

Testergebnisse für Wasserproben

Probe- nahme	Datum	1. EV	2. EV	3. EV	Gesamt- bewertung
-----------------	-------	----------	----------	----------	----------------------

Karls	03.03.97	+	-	-	-
	12.05.97	-	+	-	-
	21.07.97	+	+	-	+
	29.09.97	+	-	+	+
	12.11.97	-	-	-	-
	07.01.98	+	-	-	-

Wahnab	03.03.97	+	-	-	-
	12.05.97	-	-	- (1)	-
	21.07.97	+	-	+	+
	29.09.97	+	-	-	-
	12.11.97	- (1)	- (1)	-	-
	07.01.98	-	-	-	-

Köln	03.03.97	+	-	-	-
	12.05.97	+	+	-	+
	21.07.97	+	+	+	+
	29.09.97	-	-	-	-
	12.11.97	-	-	-	-
	07.01.98	+	-	+	+

Probe- nahme	Datum	1. EV	2. EV	3. EV	Gesamt- bewertung
-----------------	-------	----------	----------	----------	----------------------

Düss	03.03.97	+	+	-	+
	12.05.97	+	+	-	+
	21.07.97	+	+	-	+
	29.09.97	- (2)	- (2)	+	-
	12.11.97	-	-	-	-
	07.01.98	+	-	+	+

Schmil	05.02.97	-	-	- (1)	-
	02.04.97	-	-	-	-
	25.06.97	+	-	+	+
	20.08.97	- (2)	+	-	-
	15.10.97	+	-	-	-
	10.12.97	-	-	-	-

Dess	05.02.97	-	-	+	-
	02.04.97	entf.	entf.	entf.	entfällt
	25.06.97	+	+	+	+
	20.08.97	+	+	-	+
	15.10.97	+	-	-	-
	10.12.97	-	-	-	-

Probe- nahme	Datum	1. EV	2. EV	3. EV	Gesamt- bewertung
-----------------	-------	----------	----------	----------	----------------------

Schnack	05.02.97	-	-	-	-
	02.04.97	+	-	-	-
	25.06.97	+	+	+	+
	20.08.97	-	+	-	-
	15.10.97	-	-	-	-
	10.12.97	-	-	+	-

Schmil Zus.	29.04.98	-	- (2)	+	-
	13.05.98	+	+	-	+

Probe- nahme	Datum	1. EV	2. EV	3. EV	Gesamt- bewertung
-----------------	-------	----------	----------	----------	----------------------

GW Düss	20.08.97	-	+	- (1)	-
	15.10.97	+	+	-	+

Wupp	17.02.98	-	-	-	-
	24.03.98	-	-	+	-

Wundr A	16.06.98	-	-	- (1)	-
------------	----------	---	---	-------	---

Wundr B	16.06.98	-	-	- (1)	-
------------	----------	---	---	-------	---

1./2./3. EV: Ergebnisse der drei Einzelversuche

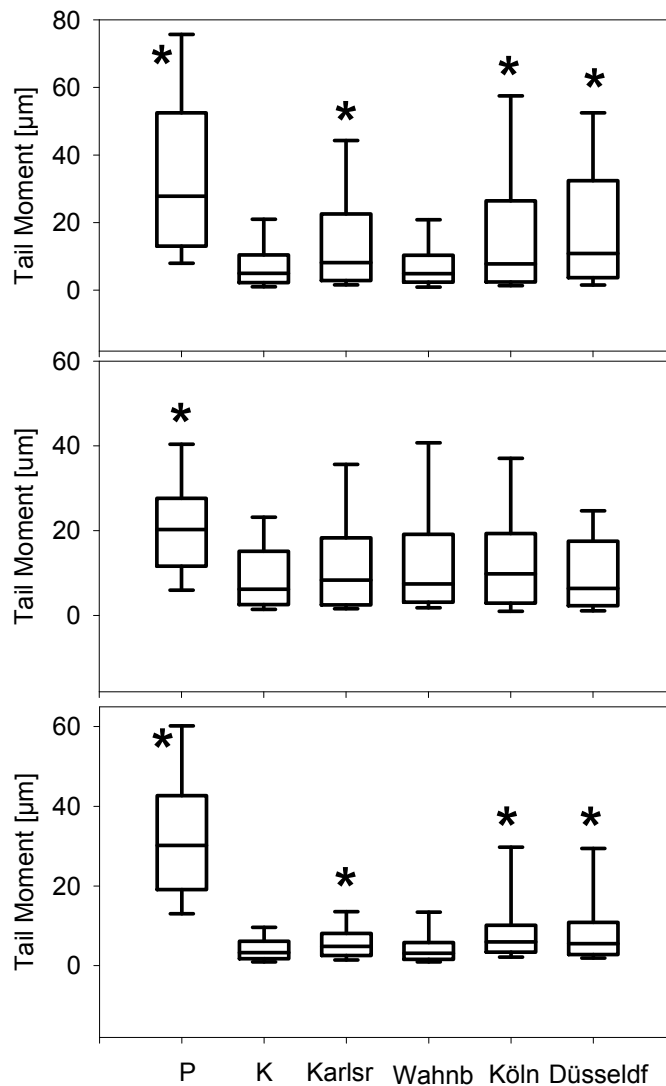
Fußnote (1): Auftreten eines signifikant kleineren Proben-Wertes im Vergleich zur Kontrolle
(Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 2,5 \%$ im Einzel-Signifikanztest)

Fußnote (2): Das Signifikanzergebnis des Einzeltests ("Tageswert") wurde wegen des übergeordneten Kriteriums - Quotient Probe/Kontrolle $\geq 1,43$ (s. Methodenteil) – umgekehrt

Anhang 2

Exemplarische Darstellung von Einzelversuchsergebnissen (als Boxplots) für Oberflächenwasserproben

Comet-Assay RTG-2; Probenahme 12 (07.01.98 Rhein)



Comet Assay mit RTG-2-Zellen: Gentoxizität (ausgedrückt als Tail Moment) an Rhein-Wasserproben eines Probenahmetermins. Für jede Probe wurden drei Versuche durchgeführt. Die Positivkontrolle wurde mit 20 µg/l NQO durchgeführt.

Die gesamten Wasserproben-Einzelversuche sind im Abschlussbericht zum Verbundvorhaben dargestellt (Nehls & Segner 1999).

Anhang 3

Einzelergebnisse zum zeitlichen Verlauf des DNA-Schadens in Abb. 13 (NQO an RTG-2-Zellen)

Zu Abb. 13 a: Zeitlicher Verlauf bei Dauerexposition

Experiment		0 h	0,25 h	0,5 h	1 h	2 h	3 h	5h	6 h	8 h	16 h	24 h
1	E1	E1 *	E1 *	E1 *	E1 *	E1 *	E1 *	E1 *	E1 *	E3 *	E5 *	E5 *
2	E2	E2 *	E2 *	E2 *	E2 *	E3 *	E2 *	E2 *	E2 *	E8 *	E7 *	E6 *
3	E3	E3 *	E3 *	E3 *	E3 *	E4 *	E3 *	E3 *	E3 *	E9 *		
4	E4	E4 *	E4 *	E4 *	E4 *		E4 *	E4 *				

Tail Moment		0 h	0,25 h	0,5 h	1 h	2 h	3 h	5h	6 h	8 h	16 h	24 h
1		3,61	18,24	32,67	37,06	41,83	26,71	27,92	23,99	35,91	3,57	3,38
2		3,73	25,42	31,54	34,32	34,65	47,82	26,65	17,61	12,17	5,27	5,89
3		6,26	39,02	54,11	43,97	53,33	47,51	43,45	37,68	7,98		
4		3,36	43,47	45,14	64,39	69,67		59,35	40,68			

"E1-E9" stehen für 9 unabhängige Experimente

* : Statistisch signifikant verschieden von der Negativkontrolle im Einzelexperiment wie im Methodenteil (2.9) beschrieben

ns : Statistisch nicht signifikant verschieden von der Negativkontrolle

Zu Abb. 13 b: Zeitlicher Verlauf nach 2 h-Exposition

Experiment		0 h	2,25 h	2,5 h	3 h	4 h	7 h	8 h	12 h	24 h
1	E1	E1 *	E1 *	E1 *	E1 *	E1 *	E1 *	E1 *	E2 *	E4 ns
2	E2	E2 *	E2 *	E2 *	E2 *	E2 *	E2 *	E2 *	E3 *	E5 ns
3	E3	E3 *	E3 *	E3 *	E3 *	E3 *	E3 *	E3 *	E6 *	

Tail Moment		0 h	2,25 h	2,5 h	3 h	4 h	7 h	8 h	12 h	24 h
1		6,26	38,21	48,81	40,49	35,25	28,09	21,78	13,40	5,69
2		3,36	41,60	46,03	32,38	40,89	27,05	27,26	10,07	4,06
3		2,61	41,98	38,16	32,21	26,24	9,43	17,34	6,90	

Abkürzungen wie oben

Anhang 4

Ergebnisse der chemischen Analysen im Mosel-Testprogramm "PNETOX" 1998

Tabelle A: Kontaminanten in den Muskeln von *Leuciscus cephalus* der vier Probenahmestationen im Programm "PNETOX" 1998 (Analysen des Centre d'Analyse et de Recherche de l'Université de Strasbourg). Angaben in µg/g Lipide bzw. mg/kg Trockengewicht.

	Eloyes	Archettes	Igney	Velle sur M.
µg/g Lipide				
op'DDE	0	0,03	0,09	0,07
Lindan	0	0,25	0	0
Hexachlorbenzen	0,13	0,07	0,08	0,05
PCB153	2,73	1,22	1,61	0,96
Summe PCBs	7,38	4,18	5,33	2,8
mg/kg Trockengewicht				
Cu	1	1,2	1	1
Hg	0,21	0,17	0,22	0,15
Pb	0	0,44	0,22	0,15
Sn	0,2	0	0,3	0,2
Zn	7,4	12,2	8,9	10

Tabelle B: Kontaminanten in Sedimenten der vier Probenahmestationen der Mosel im Programm "PNETOX" 1998 (Analysen des Centre d'Analyse et de Recherche de l'Université de Strasbourg). Angaben in µg/kg bzw. mg/kg Trockengewicht

	Eloyes	Archettes	Igney	Velle sur M.
TOC %	0,2	0,85	0,08	0,56
µg/kg TG				
Summe PAHs	292	735	34	146
Summe PCBs	7,9	1,1	40,4	1,2
mg/kg TG				
As	5,3	7,1	4,2	4,3
Cr	18,8	12,2	8,5	19,8
Cu	3,9	4,9	1,9	7
Cd	0	0,2	0	0,15
Pb	8	18,4	4,1	75,6
Hg	0	0	0	0
Ni	5,4	5,1	3,8	8,8
Zn	32,7	42,2	15,5	61,9
Sn	0	0	0	0

Anhang 5

A 5 Überblick über Prinzipien und Methodiken anderer Gentoxizitätstests im Vergleich mit dem Comet Assay

A 5.1 Comet Assay

Der **Comet Assay** ist ein Gentoxizitätstest, dessen Endpunkt unterschiedliche Arten von DNA-Schädigungen integriert. Er indiziert einerseits direkt entstandene Strangbrüche (z. B. durch ionisierende Strahlung oder Radikale verursacht), andererseits transformiert er mittels DNA-Reparatur und alkalischer Behandlung verschiedene andere DNA-Schadensarten in Strangbrüche (z. B. vor allem große bzw. DNA-deformierende - "bulky" - Addukte und alkali-labile Basenveränderungen) (s. 1.4; 4.3.2.2; 4.2.1). Außerdem kann er auch DNA/DNA-Quervernetzung (Crosslinks) anzeigen, wenn die DNA-Schäden gegenüber Kontrollen signifikant verringert - statt wie üblicherweise erhöht - sind. Es wird also ein relativ breites Spektrum von Gentoxinen durch den Test erfasst. Zusammen mit der vergleichsweise einfachen und schnellen Durchführung ist der Test spezifischeren Methoden überlegen, wenn es darum geht, relativ schnell, praktisch, sensitiv und kostengünstig ein gentoxisches Potenzial anzuzeigen. Überdies stellt er im Gegensatz zu einigen anderen Tests kaum Anforderungen an das Zellmaterial, d. h., er kann universell eingesetzt werden, z. B. als *in vitro*- oder *ex-vivo*-Test, im Labor, im Freiland-Biomonitoring oder epidemiologischen Untersuchungen und bei prinzipiell allen Eukaryonten. Zu Letzterem muss natürlich hinzugefügt werden, dass der Test nur für eine geringe Anzahl von Organismen erforscht ist und die methodische Testanpassung bei phyletisch weit entfernten Organismen und spezialisierten Zelltypen durchaus größere Probleme bergen kann, als innerhalb des Stammes der Wirbeltiere. Spezialisten auf dem Gebiet des Comet Assay gelang aber sogar eine Anwendung an Prokaryonten (Singh et al. 1999). Ebenfalls als Vorteil hervorzuheben ist die geringe Menge benötigten Zellmaterials.

Obwohl der Comet Assay einigen Gentoxizitätstests wohl klar überlegen ist, lassen sich bei manchen Fragestellungen auch Nachteile gegenüber speziellen anderen Tests ausmachen. Dazu sind einerseits Unbestimmtheiten in Bezug auf die biologische Relevanz der angezeigten DNA-Strangbrüche zu zählen, andererseits die eher unspezifische Indikation von "gentoxischer Belastung", die keine genauen Rückschlüsse auf molekulare und mechanistische Vorgänge zulässt. Diese und weitere Vor- und Nachteile des Assay hinsichtlich Methodik und biologischer Relevanz werden am deutlichsten im folgenden direkten Vergleich mit anderen Gentoxizitätstests.

A 5.2 Alkalische Filterelution, alkalische Entwindung und DNA-Elektrophoresen

Techniken wie die alkalische Filterelution (AFE), alkalische Entwindung und Elektrophoresen isolierter DNA zeigen ebenso wie der alkalische Comet Assay DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche an, sie sind also ebenfalls Indikatortests und zeigen DNA-Schadensarten an, die wohl durch genau dieselben biologischen und biochemischen Ursachen wie beim Comet Assay entstanden sind. Z.T. lassen sich die

Bedingungen in Bezug auf den pH-Wert ähnlich wie beim Comet Assay abwandeln, sodass verschiedene Arten von Strangbrüchen getrennt erfassbar sind, z. B. Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche und AP-Stellen. Der apparative Aufwand für die Fluoreszenzmikroskopie beim Comet Assay steht Apparaturen wie Chromatographiesäulen, Filtern und Pumpen bei AFE und alkalischer Entwindung gegenüber. Der Aufwand für die Durchführung der Zellpräparation ist beim Comet Assay im Vergleich wohl ähnlich, lässt sich aber hervorragend so einteilen und vorbereiten, dass der eigentliche Umgang mit dem Zellmaterial nur noch wenig Zeit in Anspruch nimmt. Außerdem kann die Auswertung durch Trocknung der Objektträger verschoben werden. Die AFE und alkalische Entwindung ermöglichen dagegen bisher wohl einen höheren Probendurchsatz pro Experiment bei höherem methodisch-apparativem Aufwand. Auch eine für den Experimentator zeitraubende Bildanalyse wie im Comet Assay ist nicht notwendig. Neueste Weiterentwicklungen des Comet Assay versprechen allerdings eine Automatisierung und erhöhten Probendurchsatz (Bocker et al. 1999; McNamee et al. 2000; Kiskinis et al. 2002). Vollautomatische Systeme werden dabei wohl hohe Anschaffungs- und Wartungskosten verursachen, aber auf die Auswertung allein bezogen, sind Automatisierung und Optimierung aufgrund der hochentwickelten und preiswerten Computertechnologie wohl keine großen finanziellen Hürden mehr.

Die Anwendungsgebiete von DNA-Elektrophoresen sind denen des Comet Assay naturgemäß sehr ähnlich. Der praktische Vorteil solcher Methoden liegt wohl - ähnlich der oben genannten alkalischen Entwindung und Filterelution - in der leichter durchzuführenden Auswertung, die für alle Zellen als Gesamtheit durchgeführt wird. Damit wird aber auch das geringere Potenzial aller drei genannten Methoden gegenüber dem Comet Assay deutlich: Sie können keine Zusatzinformationen über Verteilungen von DNA-Schäden in der ausgewerteten Zellpopulation liefern, weil die DNA der Zellen gepoolt wird. Mit diesen Zusatzinformationen können dagegen im Comet Assay Spezialanwendungen durchgeführt werden, die z. B. Auskunft über zellbiologische Einflüsse wie Zellzyklus (Olive et al. 1992; Olive & Banath 1993) oder Apoptose (s. 4.3.3.3) liefern, oder auch zwischen verschiedenen Schädigungsarten unterscheiden können. Bei Östling & Johanson (1987) wird z. B. mit Hilfe des Comet Assay zwischen Bleomycin und Gammastrahlung aufgrund der unterschiedlichen Varianz der Zellpopulationen unterschieden.

Bezüglich der Sensitivität müssen entweder direkte Vergleiche anhand von Tests an denselben Monosubstanzen oder anhand der detektierten Strangbrüche pro DNA-Menge herangezogen werden. Letzteres ist zwar nur bei Strangbruchtechniken möglich, dafür aber dort sehr sinnvoll. Dazu eignen sich am besten Messungen/Kalibrierungen mit ionisierender Strahlung, da die Strangbrüche dort quasi linear mit der Strahlungsdosis zunehmen und wegen ihrer direkten Natur wenig Varianz zeigen. Beide Arten von Vergleichen können hier nicht in Ausführlichkeit für alle Techniken gemacht werden, teils, um den Rahmen dieser Arbeit nicht zu sprengen, teils weil die Literaturdaten mit vergleichbaren Testbedingungen nicht gegeben sind. Die AFE liegt in direkten Vergleichen meist bei etwas höheren Substanzkonzentrationen als der Comet Assay (Leroy et al. 1996; Slamenova et al. 1997, s. Tab. 32; Waldmann et al. 2000), auch die alkalische Entwindung wird vom Comet Assay übertroffen, z. B. bei NQO an Fisch- und Humanzellen (vgl. vorl. Arbeit mit Hasspieler et al. 1997). DNA-Elektrophoresen, besonders Spezialanwendungen wie die Pulsed-Field-Gelelektrophorese besitzen

zumindest theoretisch das Potenzial zu sehr hohen Sensitivitäten. Normale Elektrophoresen können beispielsweise 1 - 3 Läsionen pro Megabase (Mb) detektieren, die Pulsed-Field-Gelelektrophorese 1 Läsion in mehr als 10 Mb (Sutherland et al. 1990). Die Auflösungsbereiche liegen bei Annahme eines Molekulargewichtes von 614,6 Dalton pro Nukleotidpaar bei 1) Fragmenten von ca. 0,2 bis 6 Mio. Da für die normale Agarose-Gelelektrophorese und 2) Fragmenten von ca. 3×10^7 bis 6×10^9 Da für die Pulsed-Field-Gelelektrophorese (umgerechnet nach Ang. aus Alberts et al. 1994, S. 295). Für den Comet Assay findet man Angaben über DNA-Fragmente von ca. 10^9 Da (= "wenige Tausend Strangbrüche pro Zelle") oder sogar 10^{10} Da ("0,1 Strangbruch pro 10^9 Da") bei Collins et al. (1997) bzw. Gedik et al. (1997). Einschränkungen der theoretisch sehr hohen Sensitivitäten gibt es bei den Multizell-Elektrophoresen dadurch, dass große DNA-Mengen nicht vollständig ins Gel eindringen können und so der Nenner des Quotienten Strangbrüche/DNA Menge nicht beliebig groß werden kann. Elektrophorese-Spezialtechniken sind auch auf Einzelzellen - also den Comet Assay - übertragbar und liefern dann dort eine entsprechend gute Auftrennung, die mikroskopisch genau und damit hochsensitiv erfasst wird und zusätzlich auswertbare Informationen über Einzelzellen liefert.

A 5.3 Nick Translation Assay, Einzelstrang-DNA-ELISA

Weitere Methoden zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen sind z. B. der **Nick Translation Assay** und ein **ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) für Einzelstrang-DNA**. Beim Nick Translation Assay werden Strangbrüche durch Einbau radioaktiver Nukleotide nach Fixierung der Zellen nachgewiesen. Der Umgang mit radioaktiven Stoffen erfordert Vorsichtsmaßnahmen, die beim Comet Assay nicht notwendig sind, darüber hinaus ist bei radioaktiven Methoden mehr Zeit notwendig, um von der Testdurchführung zum Ergebnis zu kommen. Der Nick Translation Assay besitzt eine geringere Sensitivität als der Comet Assay (Leroy et al. 1996). Die Nachteile radioaktiver Behandlung entfallen bei der Verwendung von Anti-Einzelstrang-Antikörpern im ELISA, allerdings handelt es sich hier nicht um einen etablierten Test, sondern eine einzelne Anwendung (Hughes et al. 1999). In dieser Anwendung korrelierten der Comet Assay und die alkalische Entwindung generell gut. Die Anwendung an Spermien stellt jedoch (wegen der speziellen DNA-Verpackung) einen Sonderfall dar, sodass weitere Ergebnisse zur Einschätzung der Sensitivität nötig wären.

A 5.4 Adduktnachweise mittels ^{32}P -Postlabeling-Methode und HPLC

Während der Endpunkt des Comet Assay und der anderen Strangbruchtests gewissermaßen ein "Summenparameter" ist, der chemisch vielfältige DNA-Veränderungen und zelluläre Reparaturreaktionen ohne Unterschiede anzeigt, existieren Methoden, deren Endpunkte der chemischen Analytik zugeordnet werden können: bekannte oder auch unbekannte **DNA-Addukte** können mittels **HPLC** oder der **^{32}P -Postlabeling-Methode** (Randerath et al. 1981; 1989) spezifisch identifiziert werden. Diese Methoden sind hochsensitiv und hochspezifisch, sodass sie zur Aufklärung von Metabolisierungs- oder DNA-Reparaturmechanismen eingesetzt werden können (z. B. Harvey & Parry 1998). Auch im Biomonitoring wird der ^{32}P -Postlabeling-Assay eingesetzt (Reichert et al. 1998; Varanasi et al. 1989; Dunn et al. 1987; Ericson et al. 1998; Harvey et al. 1988). Der ^{32}P -Postlabeling-Assay beinhaltet einen enzymatischen Abbau der DNA

bis hin zu Di- und Mononukleotiden, radioaktives Labeling, Dünnschichtchromatographie und anschließende Autoradiographie. Die verschiedenen Mono- und Dinukleotide können nach der Auftrennung voneinander unterschieden werden. Der Assay stellt damit eine aufwendigere Technik als der Comet Assay dar und liefert keine Informationen über den Zustand in einzelnen Zellen oder über direkt strangbrechende (clastogene) Agentien. Zudem erfordert er das Arbeiten mit radioaktiver Substanz. Wie der Comet Assay und andere Strangbruchtests macht er keine direkte Aussage zur Mutagenität (s.u.). Der analytische Charakter des ^{32}P -Postlabeling-Assays wird dadurch unterstrichen, dass DNA-Reparaturmechanismen der Zellen sich nicht - wie bei den alkalischen Strangbruchtests - als zusätzliche Variable direkt auf das Testergebnis auswirken.

A 5.5 UDS-Test

Der **UDS-Test** ist - wie der Comet Assay - ein Indikatortest für DNA-Schäden (UDS = Unscheduled DNA Synthesis, "außerplanmäßige DNA-Synthese"; sinngemäß ist das die DNA-Synthese außerhalb der S-Phase-DNA-Replikation), denn er zeigt die auf eine Schädigung folgende Reparatur an, in deren Verlauf neue Moleküle in den DNA-Strang eingebaut werden. Generell umfasst die UDS alle Arten von Exzisionsreparatur, also sowohl Basen-Exzisionsreparatur als auch Nukleotid-Exzisionsreparatur. Im UDS-Test werden jedoch kleinere gentoxische Noxen nur schwer oder überhaupt nicht erkannt, also solche, die vor allem Basen-Exzisionsreparatur ("short patch repair") hervorrufen (z. B. ionisierende Strahlung und kleinere "non-bulky" Addukte, z. B. bei oxidativem Stress) (Harbach et al. 1989; Swieringa et al. 1991). Einerseits besitzt der UDS-Test also eine höhere Spezifität für den Einbau von Nukleotiden als der Comet Assay, was aber auf der anderen Seite bedeutet, dass er wohl weniger Gentoxine erfasst. Obwohl Literatur dazu nicht bekannt ist, ist im Umkehrschluss anzunehmen, dass wohl alle UDS-positiven Substanzen auch im Comet Assay positiv nachzuweisen sein müssten, weil dem Nukleotideinbau laut Theorie stets enzymatische Strangsnitte vorausgehen. In der methodischen Durchführung erfordert der UDS-Test eine Synchronisation des Zellzyklus (Zellen in S-Phase müssen ausgeschlossen werden) und das Arbeiten mit radioaktiv markierten Substanzen (^3H -Thymidin) und damit - wie oben bereits gesagt - relativ viel Zeit für die Autoradiographie. Ein passives Biomonitoring von Populationen (Definition s. Einleitung, 1.3) oder *in vivo*-Versuche sind mit dem UDS-Test nicht gut möglich, weil am Organismus keine Zellsynchronisation durchgeführt werden kann. Zum Teil wird in der Praxis auf die Synchronisation jedoch verzichtet. Der Comet Assay besitzt also in puncto universeller Anwendbarkeit und Praktikabilität günstigere Eigenschaften. Methodische Anpassungen des Comet Assay, die spezifisch und ausschließlich - wie der UDS-Test - auf DNA-Reparatur ansprechen, erscheinen möglich, wären aber noch Forschungsgegenstand (s. 4.3.2.4). In Bezug auf die biologische Relevanz sollte also eine Ähnlichkeit zwischen den Testsystemen vorhanden sein, wobei der Comet Assay darüber hinaus zusätzliche Schäden erfasst und - wie gesagt - auch für *in vivo*-Tests in Frage kommt. Aussagen zur biologischen Relevanz des UDS-Tests finden sich in der Übersicht von Swieringa et al. (1991). Dort wird berichtet, dass einige Labors für den UDS-Test eine 95 %ige Korrelation mit der Karzinogenität der getesteten Substanzen angeben. Die Sensitivität des UDS-Tests kann sehr hoch liegen: Kelly & Maddock (1985) erreichten im UDS-Test mit NQO und Fisch-Primärzellen *in vitro* eine höhere Sensitivität als im hier durchgeführten Comet Assay (Tab. 32). Eine den hier vorliegenden Versuchen

vergleichbare Sensitivität (bei längerer Expositionszeit) einer Fischzelllinie *in vitro* gegenüber NQO wurde von Ali et al. (1993) erreicht (Tab. 32), bei Walton et al. (1983) lag die Sensitivität im UDS-Test mit RTG-Zellen bei einer Inkubationszeit von 3 h NQO etwas niedriger als in den hier vorliegenden Experimenten. In der o.g. Arbeit von Ali et al. (1993) wurde das Testsystem auch erfolgreich auf Sedimentextrakte angewandt.

A 5.6 Mikronukleus-Assay, Chromosomenaberrationstest, SCE-Test

Der **Mikronukleus-Assay (MNA)** steht prinzipiell anderen zytogenetischen Methoden wie den Bestimmungen von **Chromosomenaberrationen (CA)** und **Schwesterchromatidaustauschen (SCE)** nahe. Diese Methoden besitzen eine gegenüber dem Comet Assay wohl hervorgehobene biologische Relevanz, weil sie *manifestierte* Brüche von Chromosomen anzeigen, die also bereits irreversibel fixiert sind und die deutlich mit Letalität oder Funktionsstörungen der betroffenen Zellen bzw. Organismen korreliert sind. Andererseits werden andere gefährliche DNA-Schäden wie bestimmte Basenmutationen und Verschiebungen des Leserasters nicht angezeigt, sondern nur clastogene und - im MNA zusätzlich - aneugene Wirkungen ("Chromosomenmutationen"). Mikronuklei und Chromosomenaberrationen können fakultativ gemeinsam ausgewertet werden. Die Methoden erfordern proliferierende Zellen, die nach oder während der Exposition mindestens einen Zellzyklus durchlaufen müssen, bevor ausgewertet werden kann. Es muss entweder die Zytokinese im Zellzyklus geblockt werden oder der Mitoseindex mit einer Negativkontrolle verglichen werden. Im Biomonitoring bzw. in *in vivo*-Experimenten werden die Aberrationen direkt nach der Zellentnahme ausgewertet. Die Zellen werden histologisch fixiert und angefärbt. Die Auswertung bzw. Auszählung erfolgt mikroskopisch, wobei heute Bildanalysesysteme und teilweise automatisierte Systeme zu Hilfe genommen werden können. Die erreichbare Sensitivität und statistische Signifikanz hängt - wie beim Comet Assay - von der Anzahl der ausgewerteten Zellen ab, es müssen jedoch ganz wesentlich mehr Zellen zur Erreichung gleicher Sensitivität in den genannten Chromosomenaberrationstests als im Comet Assay ausgezählt werden. Beim MNA sind es meist ≥ 1000 Zellen/Probe, beim CA 100-400/Probe, wobei hier mit der Anzahl der Chromosomen multipliziert werden muss. Dies erfordert also eindeutig mehr Zellmaterial und Arbeitszeit als im Comet Assay notwendig ist, wobei der MNA dem Auswerten von CA noch überlegen ist (s. z. B. Schmid 1975; Matsuoka et al. 1993; Miller et al. 1997).

Der Mikronukleus-Assay ist eine verbreitete Methode, die sowohl schon häufig im Biomonitoring von Fischen (z. B. Arbeiten von Al-Sabti 1992; De Flora et al. 1993) als auch als *in vivo*-Test (an Fischen: Rao et al. 1997; Deventer 1996) eingesetzt wurde. *In vitro*-Anwendungen sind ebenfalls häufig, jedoch seltener an Systemen mit aquatischer Relevanz (Miller et al. 1997; Fischzelllinie BGF: Babich et al. 1990; Wasserproben an Ratten-Hepatozyten: Eckl 1995; Versuche mit RTG-2-Zellen: Rickert 1996). In einigen Ländern wird der Mikronukleus-Test an bestimmten Organismen als standardisierter Test eingesetzt, so z. B. in Frankreich an den Larven des Molchs *Pleurodeles waltl* (Le Curieux et al., 1993).

Der SCE-Test erfordert, wie der MNA und der CA-Test, proliferierende Zellen. Im SCE-Test müssen sogar zwei Zellzyklen durchlaufen werden, während derer die Chromatiden durch Markierung mit BrdU (Bromdesoxyuridin) voneinander unterscheidbar gemacht

werden. Dies kann *ex vivo* bei manchen Zellen nach der Entnahme geschehen, bedeutet aber in einigen Fällen, dass den Versuchstieren einige Tage vor der Exposition BrdU injiziert werden muss. Neben der zusätzlichen Belastung der Tiere (wobei übrigens selbst SCEs induziert werden) zeigt sich hier auch ein zeitlicher Nachteil gegenüber dem Comet Assay. Außerdem kann ein passives Biomonitoring (Definition s. Einleitung, 1.3) nur vorgenommen werden, wenn die Zellen über zwei Zyklen weiterkultiviert werden können. Im Anschluss an DNA-Markierung und Exposition wird im SCE-Test, wie auch z.T. bei MNA und CA, ein Zytokinesblock gesetzt, um die Zellen in Metaphase auswerten zu können. In Latt et al. (1981) wird die Auswertung von 25-50 Metaphasen (Zellen) / Versuchstier bzw. Konzentration empfohlen, es finden sich aber auch höhere Anzahlen. Diese müssen noch mit der Anzahl der Chromosomen multipliziert werden, wenn man die Anzahl "ausgewerteter Einheiten" beschreiben will.

Die Testsensitivität liegt bei der Erfassung von Chromosomenaberrationen wohl unter der des MNA bzw. SCE-Tests (Benigni 1992). Im SCE-Test und im MNA sind dagegen hohe Sensitivitäten möglich, wobei der SCE-Test meist der empfindlichere von den beiden ist (Eckl 1995). Dennoch ist die Sensitivität des Comet Assay meist noch höher (Van Goethem et al. 1997, Vergleich der Daten der vorliegenden Arbeit mit Angaben aus Latt et al. 1981: Sensitivitäten im SCE-Test für NQO bis 10^{-7} mol/l, also unempfindlicher, bei MNNG ebenfalls bis 10^{-7} mol/l, also vergleichbar). In Einzelfällen, wo der MNA eine höhere Sensitivität als der Comet Assay zeigte (Le Curieux et al., 1993; s. Tab. 32), wurde eine wesentlich längere Expositionszeit mit Erneuerung des Expositionsmediums verwendet, was die gefundene Sensitivität relativiert. Bei gleicher Expositionszeit und gleicher Testsubstanz ist der MNA wohl weniger sensitiv als der Comet Assay, vorausgesetzt, beide Tests sprechen an. Sensitivitätsunterschiede können sich natürlich auch substanzabhängig zeigen (s. 3.4.2), wobei eine längere Expositionszeit meist eine besondere Empfindlichkeit gegenüber indirekt gentoxischen Stoffen zur Folge hat. Es kann umgekehrt vorkommen, dass die Sensitivität gegenüber direkt gentoxischen Stoffen bei längerer Expositionszeit gering ist, z. B. weil Zellen vor der Auswertung bereits abgestorben sind. Weiterhin hängen substanzabhängige Unterschiede von den spezifischen mechanistischen Eigenschaften der Tests ab. So können aneugene Wirkungen (Fehlverteilungen von Chromosomen) im Comet Assay nicht angezeigt werden, aber im MNA. Auch bei Vergleichen von SCE-Test und Comet Assay zeigten sich differierende Ergebnisse für verschiedene Substanzen (Hartmann & Speit 1994; Hartmann & Speit 1995). Effekte des Rauchens oder von Sport beim Menschen konnten mit dem Comet Assay, nicht aber mit dem SCE-Test detektiert werden (Betti et al. 1994; Niess et al. 1996). Diese Vergleiche der testspezifischen Nachweise führen vom rein methodischen Vergleich wiederum zur biologischen Relevanz und werden in den entsprechenden Kapiteln (4.5.3 und 4.3.2.7) besprochen.

A 5.7 SOS-Chromotest, Ames-Test und umu-Test

Bakterielle Tests wie der **SOS Chromotest** (Quillardet et al. 1982), der **Ames-Test** (Ames et al. 1975; Maron & Ames 1983) und der **umu-Test** (Reifferscheid et al. 1991; DIN UA 12; 1994) sind oft standardisiert und als Routinetests weit verbreitet. Der Ames-Test ist der wohl bekannteste Gentoxizitätstest überhaupt. Während der Ames-Test ein echter **Mutationstest** ist, indizieren umu- und SOS-Chromotest die DNA-Reparatur der Bakterien als Antwort auf gentoxische Noxen. Wegen der einfachen Kultivierung von

Bakterien und weil die Auswertungen auf einfacher Auszählung bzw. kolorimetrischer Messung beruhen, besitzen die bakteriellen Tests eine hohe Praktikabilität und einen hohen möglichen Probendurchsatz. Die Arbeiten mit dem Bakterium *Salmonella typhimurium* (Ames- und umu-Test) stellen allerdings besondere Sicherheitsanforderungen an das betreffende Labor. Da die eigentlich interessierenden Organismen für Gentoxizitätstests Eukaryonten sind und Bakterien sich von ihnen in der enzymatischen Ausstattung grundlegend unterscheiden, sind in die Verfahren externe metabolische Aktivierungssysteme aus Säugern - die S9-Extrakte - integriert worden. Wenn auch die Gewinnung von S9 inzwischen wohl ein etabliertes Verfahren ist, und der Extrakt kommerziell erhältlich ist, so stellt dies dennoch einen zusätzlich notwendigen Präparationsschritt und eine Belastung und einen Verbrauch von Tieren dar. Wie sonstige eukaryontische Testsysteme birgt die Herstellung und Verwendung von S9 auch Varianzquellen. In der vorliegenden Arbeit wurde gesehen und auch an anderen Beispielen belegt, dass S9 beispielsweise die Wirkung von Schadstoffen reduzieren kann. Ein Gesichtspunkt, der bisher kaum beachtet wurde, ist, dass auch sogenannte direkt gentoxische Stoffe meist eine Metabolisierung benötigen (s. 4.2.1.1) und dass diese weder durch S9 rekonstituiert werden können, noch in Bakterien vorhanden sind. Oft sind in Bakterien allerdings funktionell analoge Enzymsysteme für grundlegende zelluläre Mechanismen vorhanden, auf welche direkt gentoxische Stoffe oft einwirken. So ist wohl auch zu erklären, dass mit dem Ames-Test (mit und ohne S9) gute Korrelationen zwischen Ames-Test-positiven Substanzen und Säuger-Karzinogenen erreicht wurden. Als Nachteil gegenüber dem Comet Assay stellt sich auch dar, dass ein passives Biomonitoring (Definition s. Einleitung, 1.3) mit den bakteriellen Tests nicht vorgenommen werden kann. Vielmehr kann ein Nachweis gentoxischer Potenziale in Mensch und Tier nur indirekt über die Testung von Körperflüssigkeiten und Sekreten (z. B. Urinproben) oder - weitaus aufwendiger und im Humanbiomonitoring meist ausgeschlossen - Extrakten aus Organen erfolgen.

Die Korrelation von positiven Tests mit den Klasse-1-Karzinogenen (gemäß Lewis 1991) ist nach Quillardet et al. (1982) im Ames-Test 77 % und im SOS-Chromotest 62 %. Ames stellte selbst die Aussage "Carcinogens are mutagens" auf (Ames et al. 1973), und auch in darauffolgenden Untersuchungen hat der Test einen hohen Vorhersagewert für Karzinogenität bei Nagern bewiesen (Übersicht in Mortelmans & Zeiger, 2000). Hier kommt sicher zum Tragen, dass es sich um einen Mutationstest handelt. Wie oben gesagt, sind bakterielle Systeme jedoch vermutlich nicht für spezifische Zustände in Eukaryontenzellen aussagekräftig und ein direkter Nachweis von Schädigungen bei Eukaryonten kann mit dem Test nicht geführt werden. Weiteres zur Korrelation der Tests siehe Kapitel 4.5.3.

Während bei Le Curieux et al. (1993) und in eigenen Versuchen mit einem Testkit (nach Fish et al. 1987) (Daten hier nicht dargestellt) im SOS-Chromotest die Sensitivität des Comet Assay nicht erreicht wurde, bieten der Ames- und der umu-Test für einige Substanzen ein Maximum an Sensitivität (Tabelle 32: Hubbard et al. 1981; Le Curieux et al. 1993).

A 5.8 Mutationstests an Eukaryonten *in vivo*

Schließlich sollten ***in vivo*-Mutationstests an Eukaryonten** nicht unerwähnt bleiben. Der Nachweis der Mutagenität wird hier direkt im interessierenden oder nahe verwandten Organismus geführt und dementsprechend wird auch ein hoher Wert zur Vorhersagbarkeit karzinogener Wirkungen beigemessen. Zusammen mit dem Ames-Test und dem Mikronukleus-Assay werden solche Tests wohl zur Chemikalienprüfung, vor allem wenn eine gute Absicherung gefragt ist, am häufigsten eingesetzt. Dabei werden Mutationen bestimmter Gene in den Zellen der behandelten Tiere detektiert, einige Mutationen werden auch anhand des Phänotyps äußerlich am Tier erkannt (z. B. Fellflecken-Test, Flügelflecken-Test). Vorwiegend werden Ratten und Mäuse eingesetzt. Außerdem vorherrschend sind Tests, die Mutationen untersuchen, welche den Zellen entweder eine metabolische Resistenz gegen einen bestimmten Stoff oder umgekehrt eine Abhängigkeit von einem bestimmten Stoff verschaffen, sodass sie in Zellkultur von den Wildtyp-Zellen unterschieden werden können. Häufig wird das *hprt*-Gen als Testgen verwendet, welches für das Enzym HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) codiert und Resistenz gegen die Purinanaloga 6-Thioguanin und 8-Azaguanin verleiht. Durch Zugabe der Purinanaloga werden normale Zellen abgetötet, während die *loss-of-function*-mutierten Zellen überleben und deren Anteil quantitativ bestimmt werden kann. Nach gleichem oder ähnlichen Prinzip funktionieren Nachweise weiterer mutierter Gene, z. B. des *tk*-Gens (TK = Thymidinkinase), wobei auch *gain-of-function*-Mutationen festgestellt werden können. Alle diese Tests haben ihre spezifischen Eigenheiten, so kann z. B. der Test mit dem *tk*-Gen nur an heterozygoten Zelllinien, also *in vitro* durchgeführt werden, da das Gen rezessiv ist. Außerdem ist zu beachten, dass z. B. die Wiederherstellung einer Genfunktion (gain of function) oft nicht von nur einem einzelnen Gen abhängt, die "Trefferquote" also anders als bei der Punktmutation eines Gens ist. Dies gilt z. B. auch für die Reversion des His⁻ Phänotyps zu His⁺ im Ames-Test (der jedoch prokaryontisch ist).

Der HPRT-Test wird hauptsächlich an Lymphozyten durchgeführt. Mehr Freiheit bei der Auswahl des Zelltyps bieten Tests, bei denen die Mutationen entweder durch molekularbiologische Methoden oder mit Hilfe transgener Mäuse identifiziert werden. Über **molekularbiologische Identifikationsmethoden** wie **Sequenzanalyse** oder **Hybridisierung mit komplementären DNA-Proben** kann theoretisch jede beliebige Mutation untersucht werden, allerdings muss die normale Sequenz des Gens zuvor mindestens teilweise bekannt sein und das Gen muss isoliert und (PCR-) amplifiziert werden. Derartige Methoden werden zur Zeit immer ausgefeilter, schneller und kostengünstiger. Die transgenen Systeme funktionieren nach einem anderen Prinzip: Dort werden Mutationen in fast beliebigen Zellen von Mäusen festgestellt, wobei aber nur bakterielle Gene z. B. die *lacZ* und *lacI*-Gene aus *E. coli* untersucht werden, die in diese Mäuse zuvor transferiert wurden (z. B. "Big Blue" und "MutaMouse"-Stämme). Zum Nachweis muss die DNA aus den Säugerzellen extrahiert und über Phagen wieder in Bakterien transferiert werden.

Wenn der Nachweis der *lac*-Mutationen auch als relativ praktisch bezeichnet wird, so ist doch klar, dass diese und die anderen genannten Methoden des Mutationsnachweises *in vivo/ex vivo* immer noch aufwendiger oder in der Geräteanschaffung teurer sind als viele Gentoxizitätstests - einschließlich des Comet Assay. Die Testdauer der Mutationstests beträgt Tage bis mehrere Wochen. Bei den transgenen Systemen kann zudem die Relevanz kritisiert werden, da ja die Mutation transferierter bakterieller Gene

und nicht die von im Zellkern lokalisierten Säugergenen gemessen wird. Auch Tests an Insekten (*Drosophila*) sind nicht vollkommen auf Säuger übertragbar, wenn Sie auch im Prinzip diesen näher stehen als Prokaryonten. Was die Sensitivität angeht, soll hier zunächst kein direkter Vergleich angestellt werden, da die *in vivo*-Applikation sich von der *in vitro*-Applikation unterscheidet. Soweit es nicht den Rahmen dieser Arbeit sprengt und Vergleichsdaten überhaupt vorhanden sind, wird darauf im Kapitel 4.5.3 noch eingegangen.

A 5.9 Literatur zu den Anhängen

Die Literaturstellen zu den Anhängen sind im Gesamt-Literaturverzeichnis dieser Arbeit integriert.

Publikationsliste

Veröffentlichungen in Zeitschriften/Büchern

- Brack, W., Altenburger, R., Ensenbach, U., Nehls, S., Segner, H., Schüürmann, G. (2000): Wirkungsorientierte Identifikation toxischer organischer Inhaltsstoffe in Flußsedimenten. In: Stoffhaushalt von Auenökosystemen - Böden und Hydrologie, Schadstoffe, Bewertungen. (Hrsg.: Frieze, K. Witter, B., Miehlisch, G., Rode, M.) Springer-Verlag, Berlin, 337-
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P., Garric, J. (2002): Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51 (2), 145-153
- Glos, M., Braunbeck, T., Deventer, K., Miltenburger, H.G., Nehls, S., Obst, U., Schnurstein, A., Segner, H., Wessler, A. (2000): The comet assay as a tool to detect the genotoxic potential of surface water samples: *in vivo* and *in vitro* assays using green algae, protozoa, molluscs, fish, as well as primary and permanent cell cultures from fish and mammals. In: Forschungsverbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser" 1995-1999. (Ed: Grummt, T) Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung, Außenstelle Dresden, Dresden, 97-114.
- Nehls, S., Segner, H. (2001): Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay. *Environmental Toxicology* 16 (4), 321-329.
- Nehls, S., Segner, H. (2005): Comet assay with the fish cell line Rainbow Trout Gonad-2 for *in vitro* genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (8), 2078-2087

Projektbericht

- Nehls, S., Segner, H. (1998): Abschlussbericht zum Verbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächengewässer"; Teilprojekt 7: "Weiterentwicklung, Anpassung und Beurteilung der Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) an Primärzellen und permanenten Zelllinien von Fischen zum Nachweis gentoxischer Potentiale in Oberflächenwasser - *in vitro* Screening"; Förderkennzeichen 02 WU 9555/7

Diplomarbeit

- Nehls, S. (1994): Beobachtungen und Experimente zur Frühentwicklung von *Hydractinia echinata* (Fleming 1828), Diplomarbeit, Freie Universität Berlin

Poster

- Brack, W., Altenburger, R., Ensenbach, U., Nehls, S., Segner, H., Schüürmann, G. (1998): Hazard assessment of contaminated sediment using a biotest battery. Poster, 8th Ann. Meeting of SETAC Europe, Bordeaux (F), 14.-18.04.
- Ensenbach, U., Altenburger, R., Behrens, A.; Brack, W., Knops, M., Navas, J.M., Nehls, S. Schrag, B., Segner, H., Sturm, A., Walter, H., Schüürmann, G. (1997): Ökotoxikologische Analyse komplexer Stoffgemische. Poster DGL Tagung Frankfurt, 22.-26.9.
- Nehls, S., Schüürmann, G., Segner, H. (1996): Indikation subletaler Wirkungen von Umweltchemikalien: Nachweis gentoxischer Effekte durch den Comet Assay. Poster, GDCH-Tagung, Ulm, 7.-10.10.
- Nehls, S., Schüürmann, G., Segner, H. (1997): *In vitro* genotoxicity screening: The comet assay in fish cells with different biotransformation capabilities. Poster, 7th Annual Meeting of SETAC-Europe, Amsterdam (NL), 6.-10.4.
- Nehls, S., Segner, H. (1998): Anpassung des Comet Assays als *in vitro*-Gentoxizitätstest für Wasserproben: Vergleich unterschiedlicher Fischzellsysteme anhand von Exposition an Einzelsubstanzen. Poster, 3. deutschsprachige SETAC Europe-Tagung, Zittau, 18.-19.05.
- Nehls, S., Segner, H. (2001): Steps towards describing Reproducibility and Identifying Sources of Variance of the Comet Assay with the Fish Cell Line RTG-2. Poster, International Comet Assay Workshop, , Ulm, 22.-24.07.2001.

- Nehls, S., Brack, W., Segner, H., Schüürmann, G. (1998): Identification of Genotoxic Fractions of a Contaminated Sediment using the Comet Assay and the SOS Chromotest. Poster, 8th Ann. Meeting of SETAC Europe, Bordeaux (F), 14.-18.04.
- Segner,H, Altenburger,R, Behrens,A, Ensenbach,U, Knops,M, Nehls,S, Zinnecker,M, Schüürmann,G (1996): Verbesserung der Aussagefähigkeit von Labortests: Beispiele aus der aquatischen Ökotoxikologie. Poster SETAC Tagung TU Braunschweig, 14.3.-15.3.1996.

Erklärungen gemäß § 5, Abs. 2 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich,

1) dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe;

und

2) dass ich mich erstmals um den Doktorgrad bewerbe;

und

3) dass mir die zugrundeliegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität vom 01.10.2002 bekannt ist.

Sebastian Nehls

Berlin, den 17.01.2013.

Danksagung

Zahlreiche Personen und einige Institutionen haben die vorliegende Arbeit ermöglicht, ich möchte ihnen hiermit sehr herzlich danken:

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), das den Großteil dieser Arbeit im *Verbundvorhaben "Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächenwasser, Teil 7: Comet Assay an Primärzellen und permanenten Zelllinien von Fischen"*, unter dem Förderkennzeichen 02-WU9555/7, finanziert hat.

Dem Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH und dem Sektionsleiter der Chemischen Ökotoxikologie, Herrn Prof. Dr. G. Schüürmann, für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten.

Herrn Prof. Dr. Helmut Segner (Leiter der Arbeitsgruppe Aquatische Ökotoxikologie im Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH; jetzt Professor am Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Universität Bern, Schweiz) für die intensive und anregende und Betreuung dieser Arbeit, die Aktivierungsenergie am Anfang und die Geduld, die zum Schluss noch notwendig war.

Herrn Prof. Dr. Werner Kloas (Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei / Humboldt-Universität zu Berlin) für die freundliche Übernahme der abschließenden Betreuung des Dissertationsvorhabens in Berlin!

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Aquatische Ökotoxikologie für das gute Arbeitsklima, hilfsbereite Zusammenarbeit und eine "gute Zeit".

Den Wissenschaftlern und Instituten, die mir durch Diskussionen, Demonstrationen und Aufenthalte in ihren Instituten die Einarbeitung in das Thema erleichterten: Herrn Dr. Rainer Helbig (Cytotest Cell Research, CCR-RCC Roßdorf), Andrea Sokolowski, (CCR-RCC Roßdorf), Herrn Prof. Dr. Herbert G. Miltenburger (CCR-RCC Roßdorf und Univ. Darmstadt), Herrn Matthias Fröhner (TU Dresden), Herrn Dr. Stefan Scholz (TU Dresden), Frau Nasreen Rahman (Univ. Heidelberg), Herrn Dr. Andreas Schnurstein (Univ. Heidelberg), Herrn Dr. Henner Hollert (Univ. Heidelberg), Herrn PD Dr. Thomas Braunbeck (Institut für Zoologie I der Universität Heidelberg). Anm.: Ich bitte um Verzeihung: die Akademischen Titel beziehen sich auf den Zeitpunkt der Zusammenarbeit – auch hier gab es inzwischen Fortschritte!

Den studentischen Hilfskräften Christine Zipfel, Christian Schäfer und Daniela Görden.

Dr. Alain Devaux (ENTPE, Vaulx en Velin/Lyon und INRA, Rennes, Frankreich) für die sehr freundliche Aufnahme, hervorragende Gastfreundschaft, die Diskussion neuer Aspekte und die gewährten Freiräume für die schriftliche Bearbeitung dieser Arbeit.

Der ENTPE (École Nationale des Travaux Publics de l'État, Vaulx en Velin/Lyon, Frankreich) und ihrem Ökotoxikologie-Team sowie den Mitarbeitern des Mosel-Biomonitorings für die Arbeitsmöglichkeiten im Labor, die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit.

Den Erfindern und Teilnehmern der "Comet Assay Newsgroup" im Internet für die interessanten und hilfreichen Diskussionen "Comet-spezifischer" Fragen.

Den Freunden und Verwandten, die mir finanzielle und persönliche Unterstützung gewährt haben, um diese Arbeit zuende zu führen.